Jéssica Cristine Viera Machado Santini
Michele Rorato Sagrillo
(organizadoras e autoras)

Spirulina maxima:

DO CULTIVO A APLICAÇÃO (NANO) BIOTECNÓLOGICA

Liana da Silva Fernandes
Aline Rossato
Walter Paixão de Sousa Filho
Luiz Fernando Rodrigues Junior
Kéllen Francine Anschau
Vinicius Machado Neves
Rosana de Cássia de Souza Schneider
Victor dos Santos Barboza
Rodrigo de Almeida Vaucher
Sérgio Roberto Mortari
coautores

Ano 2024

Jéssica Cristine Viera Machado Santini
Michele Rorato Sagrillo
(organizadoras e autoras)

Spirulina maxima:

DO CULTIVO A APLICAÇÃO (NANO) BIOTECNÓLOGICA

Liana da Silva Fernandes
Aline Rossato
Walter Paixão de Sousa Filho
Luiz Fernando Rodrigues Junior
Kéllen Francine Anschau
Vinicius Machado Neves
Rosana de Cássia de Souza Schneider
Victor dos Santos Barboza
Rodrigo de Almeida Vaucher
Sérgio Roberto Mortari
coautores

Ano 2024

Spirulina maxima: do cultivo a aplicação (nano) biotecnólogica

MULTIDISCIPLINAR

Diagramação: Ellen Andressa Kubisty
Correção: Maiara Ferreira
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores
Organizadores: Jéssica Cristine Viera Machado Santini
Michele Rorato Sagrillo

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S759 *Spirulina maxima*: do cultivo a aplicação (nano) biotecnólogica / Organizadoras Jéssica Cristine Viera Machado Santini, Michele Rorato Sagrillo. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2024.

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia
ISBN 978-65-258-2339-3
DOI: https://doi.org/10.22533/at.ed.393240703

1. Água. 2. Microalga. 3. Nanotecnologia. I. Santini, Jéssica Cristine Viera Machado (Organizadora). II. Sagrillo, Michele Rorato (Organizadora). III. Título.

CDD 577.6

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

MULTIDISCIPLINAR

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.

DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Atena Editora declara, para os devidos fins de direito, que: 1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, direito sobre a publicação, inclusive não constitui responsabilidade solidária na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código Penal e no art. 927 do Código Civil; 2. Autoriza e incentiva os autores a assinarem contratos com repositórios institucionais, com fins exclusivos de divulgação da obra, desde que com o devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial; 3. Todos os e-book são *open access, desta forma* não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de *e-commerce,* ou qualquer outro meio virtual ou físico, portanto, está isenta de repasses de direitos autorais aos autores; 4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro; 5. Não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra.

Na busca incessante pela disponibilidade de água de qualidade para consumo humano, a comunidade global tem direcionado esforços significativos em direção aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável, estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para o milênio. Nesse contexto, a atenção voltada para tecnologias limpas, sustentáveis e orgânicas tem se intensificado, destacando a necessidade não apenas de identificar espécies vegetais capazes de sintetizar compostos específicos em larga escala, mas também de aprimorar o conhecimento para otimizar esses processos.

A microalga *Spirulina maxima* emerge como um protagonista crucial, revelando-se em diferentes ambientes, desde águas salobras até fontes termais. Sua capacidade de adaptação a condições ambientais extremas a torna uma candidata promissora para aplicações diversas, incluindo na indústria alimentícia, medicamentos, biocombustíveis, agricultura e biorremediação de águas residuais. Este organismo unicelular demonstra versatilidade e potencial para contribuir significativamente para a sustentabilidade e a qualidade ambiental.

No cenário da nanotecnologia, sua integração com estratégias de remediação destaca-se como uma alternativa economicamente promissora para a descontaminação de águas. As nanoesferas, constituídas por polímeros biodegradáveis, ganham destaque devido à sua estabilidade nos fluidos biológicos durante o armazenamento. No entanto, neste livro, exploramos uma abordagem inovadora ao utilizar a biomassa microalgal, rica em ácidos graxos, como biossurfactantes no processo de descontaminação de águas, proporcionando uma perspectiva única e sustentável.

O desenvolvimento de materiais destinados ao tratamento e purificação de água revela-se crucial diante da presença de patógenos emergentes em águas residuais, representando ameaças à saúde pública. Materiais baseados em nanotecnologia destacam-se por sua catálise aprimorada e alta área de superfície, resultando em uma eficácia notável no tratamento de contaminantes ambientais.

Explorando as fronteiras da inovação, os nanofiltros microalgais surgem como uma alternativa revolucionária aos sistemas tradicionais. Nesse contexto, este livro visa não apenas contribuir para a evolução tecnológica, mas também para o equilíbrio entre crescimento econômico e preservação ambiental, promovendo soluções eficazes no combate e remediação da poluição hídrica.

RESUMO

Relevância: A contaminação de águas naturais tem sido um dos grandes problemas da sociedade moderna. Embora existam diversas tecnologias que utilizam processos físicos e/ou químicos para a descontaminação de águas, o processo biológico de biorremediação é uma alternativa ecologicamente mais adequada, sustentável e eficaz. ***Objetivos:*** Mediante a esta problemática, o presente trabalho teve como objetivo a obtenção de um filtro utilizando a nanotecnologia nos processos de floculação, preparação de nanoesfera e nanofibras a base de *Spirulina maxima.* ***Materiais e métodos:*** A *Spirulina maxima* foi cultivada, floculada e a partir da biomassa constituiu-se a matéria prima para a obtenção de fibras por e*letrospinning.* ***Resultados:*** A nanoquitosana produzida em temperatura ambiente apresentou maior rendimento de obtenção de biomassa; a nanoesfera produzida apresentou características de tamanho 309 ± 14,1nm, pH 6,7; PDI 0,308 ± 0,05 e potencial zeta de - 30,9 ± 2,27 mv. A obtenção de filtros por *eletrospinning* e a caracterização dos filtros por MEV comprovaram o diâmetro nanométrico das fibras produzidas, demonstrando uma maior eficácia em relação à vazão, potabilidade e parâmetros microbiológicos ao filtro produzido com agulha de 22 G de diâmetro. ***Conclusões:*** A partir dos resultados encontrados, o filtro produzido, revelou-se um potencial de aplicação em processos de biorremediação de água, verificada pela eficácia quanto à vazão e resistência, retenção de microrganismos termolábeis, diminuição da carga viral do vírus SARS-CoV-2, sendo comprovado por laboratórios credenciados a Fundação Estadual de Proteção Ambiental - FEPAM – RS, parâmetros de potabilidade da água.
PALAVRAS – CHAVE: água; biorremediação; microalgas; filtros; nanotecnologia

ABSTRACT

Relevance: The contamination of natural waters has been one of the biggest problems in modern society. Although there are several technologies that use physical and/or chemical processes to decontaminate water, the biological process of bioremediation is a more ecologically appropriate, sustainable and effective alternative. Objectives: Given this problem, the present work aimed to obtain a filter using nanotechnology in the flocculation processes, preparation of nanospheres and nanofibers based on Spirulina maxima. Materials and methods: Spirulina maxima was cultivated, flocculated and the biomass was used as raw material to obtain fibers by electrospinning. Results: Nanochitosan produced at room temperature showed a higher yield of biomass; the nanosphere produced presented characteristics of size 309 ± 14.1nm, pH 6.7; PDI 0.308 ± 0.05 and zeta potential of - 30.9 ± 2.27 mv. Obtaining filters by electrospinning and characterizing the filters by SEM proved the nanometric diameter of the fibers produced, demonstrating greater effectiveness in relation to flow, potability and microbiological parameters compared to the filter produced with a 22 G diameter needle. Conclusions: Based on the results found, the filter produced revealed potential for application in water bioremediation processes, verified by its effectiveness in terms of flow rate and resistance, retention of heat-labile microorganisms, reduction of the viral load of the SARS-CoV virus- 2, being proven by laboratories accredited by the State Foundation for Environmental Protection - FEPAM – RS, water potability parameters.
KEYWORDS: water; bioremediation; microalgae; filters; nanotechnology

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO

A disponibilidade de água para consumo humano em quantidade e qualidade equivalentes é um dos objetivos do milênio almejados pela cúpula da Organização Mundial de Saúde (OMS). O crescente interesse por tecnologias limpas, sustentáveis e orgânicas para a obtenção de produtos para o consumo humano, traz a necessidade, não apenas, de uma contínua busca por espécies vegetais capazes de sintetizar grandes quantidades de compostos específicos, mas de conhecimentos para potencializar a síntese desses produtos. Dessa maneira, também são necessárias pesquisas visando o desenvolvimento, aperfeiçoamento dos sistemas de produção em escala comercial de forma a viabilizar economicamente o acesso facilitado da população a estes sistemas. Sem dúvida, é muito grande a quantidade de compostos de interesse comercial que ainda podem ser obtidos através dos cultivos das microalgas.

O crescente interesse no estudo da *Spirulina maxima* se deve principalmente a fatores biológicos, ecológicos e econômicos. No âmbito biológico, o valor agregado deste grupo de organismos está na estruturação da atual atmosfera terrestre pela produção de maior parte do O_2 da atmosfera (CHU *et al*., 2010). Observando também o fato de se constituírem em produtores primários, atribui às algas a importância ecológica na medida em que estas sustentam a vida nos mares e oceanos desempenhando, assim, um papel ecológico fundamental na manutenção destes ecossistemas (VIDOTTI, 2004).

Quando relacionado a importância econômica das microalgas, esta é determinada pela sua diversidade na aplicação comercial, não apenas na indústria alimentícia, medicamentos, biocombustíveis, como também, agricultura, biorremediação de águas residuais e uso cada vez maior em atividades com a finalidade de sustentabilidade e qualidade ambiental (VIDOTTI, 2004).

A *Spirulina maxima* tem sido encontrada nos mais diferentes ambientes como águas salobras, mar, lagoas salinas, águas subárticas, lagoas tropicais, e fontes de águas termais. Assim, estes organismos podem ser capazes de adaptação a condições ambientais extremas (CIFERRI e TIBONI, 1985).

Uma das grandes vantagens destes microrganismos está na capacidade de serem cultivados em diversos sistemas de produção, com volume variando desde poucos até bilhões de litros. Os sistemas comumente empregados são pouco sofisticados, uma vez que podemos desenvolver cultivos em pequena escala laboratorial e a céu aberto, sob condições naturais de iluminação, temperatura, e com baixo ou nenhum controle destes parâmetros ambientais. Por se reproduzirem muito rapidamente, proporcionando uma grande quantidade de biomassa, chamam cada vez mais a atenção de setores que necessitam de grandes quantidades de matéria-prima. Isso porque a biomassa de microalgas possui vantagens consideráveis sobre matérias-primas tradicionais, e além disso é uma tecnologia limpa mas com algumas restrições nas questões de demanda energética., permitindo se ter produto/bio verde (BOROWITZKA, 1999).

Após a seleção do sistema de cultivo a ser utilizado, é preciso realizar a separação das pequenas porções residuais contidas no meio onde estão presentes, havendo a necessidade de sua otimização. Este processo pode envolver uma ou mais etapa, como a utilização de compostos para floculação, dentre eles a nanotecnologia vem demonstrando eficácia a exemplo, da nanoquitosana (HALIM *et al*., 2012). Extraída de exoesqueleto de crustáceos, insetos e fungos, a quitosana é o segundo polímero mais abundante na natureza, insolúvel em água e com características importantes como biocompatibilidade e baixa toxicidade (DUARTE *et al*., 2009). Tendo em vista o amplo cenário dentro da perspectiva do desenvolvimento de novos produtos, a obtenção de nanopartículas poliméricas utilizando biopolímeros como a quitosana, como eficiente floculante, tem se tornado cada vez mais comuns e viáveis em decorrência de sua baixa toxidade e boa estabilidade (TIYABOONCHAI, 2003).

A nanotecnologia aliada à remediação é vista como uma alternativa economicamente promissora na atuação para a descontaminação de águas. Com isso, as nanoesferas constituídas por polímeros biodegradáveis têm atraído maior atenção dos pesquisadores devido às suas potencialidades e maior estabilidade nos fluídos biológicos durante o armazenamento (SCHAFFAZICK *et al.,* 2003). As nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica, onde a substância pode ficar retida ou adsorvida, não possuem óleo como constituinte da sua composição. Entretanto, no presente trabalho com a utilização da biomassa microalgal, contendo ácidos graxos na sua matriz química, atuam como biossurfactantes nos processos de descontaminação de águas (RIBEIRO *et al.,* 2008).

O desenvolvimento de materiais para o tratamento e purificação de água, é fundamental para o controle de patógenos emergentes, como microrganismos termolábeis presentes em águas residuais causadores de processos patológicos com consequências e riscos à saúde pública (TANG *et al*., 2020).

As características e eficiência dos materiais baseados em nanotecnologia os tornam adequados para o tratamento de contaminantes ambientais, pois possuem catálise aprimorada, alta área de superfície que reflete na elevada área de contato com água, implicando na sua efetividade (DWEVEDI, 2019).

Quando se fala em novas tecnologias, podemos remeter aos nanofiltros microalgais, com uma principal vantagem em comparação com os sistemas tradicionais: exigem menos pressão para que a água passe pelo filtro, são mais eficientes, tem áreas de superfície muito grandes e podem ser limpos facilmente por meio de retro descarga (SAVAGE; DIALLO, 2005).

Busca-se cada vez mais aliar o crescimento econômico com proteção ambiental, desenvolvendo-se produtos por meio da nanotecnologia, novas alternativas de processos e técnicas eficientes no combate e remediação da poluição.

Com isso o objetivo do presente trabalho foi desenvolver um filtro utilizando a nanotecnologia na floculação da biomassa, no seu aproveitamento para a produção de

nanoesfera, tendo em vista que a filtração de água por meio de nanofibras é amplamente superior aos materiais de filtração tradicionais, tanto a nível operacional como desempenho geral, pois a qualidade de um filtro é definida pela sua eficiência em retirar partículas e pela capacidade de retenção de seu meio filtrante.

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MICROALGA *SPIRULINA MAXIMA*

A linhagem de microalga do tipo *Spirulina maxima*, procedente do Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria/RS, foi cultivada em *erlenmeyers* de 100 mL com 4 diferentes meios de cultivo (BG 11, Schu-10, BB e Zarrouk) a fim de encontrar o meio de cultivo apropriado a uma maior quantidade de células e de biomassa.

2.2 DENSIDADE ÓPTICA

A densidade óptica, (X, $g.L^{-1}$) foi determinada a cada 48h a partir da leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 670 nm (LOURENÇO, 2006).

2.3 MEIOS DE CULTIVO

Os meios selecionados para cultivar as microalgas do gênero *Spirulina* foram BG-11, BB, CHU-10 e Zarrouk. O meio BG 11 foi o mais apropriado quanto aos parâmetros analisados pH e densidade óptica.

Os cultivos foram realizados em ambiente com temperatura de 24 ºC, umidade em torno de 60%, luminosidade com fotoperíodo de alternância 14/10h, claro/escuro, lâmpadas T8 red de 40 W, pH inicial em torno de 9,3, sendo cultivadas durante 16 dias.

2.4 CONTAGEM CELULAR

A contagem celular foi realizada através de Microscopia óptica em lâminas a cada 48h. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

2.5 FILTRAÇÃO E SECAGEM

O cultivo da microalga *Spirulina maxima* foi submetido ao processo de filtração a vácuo, onde foi removida a biomassa microalgal úmida. A solução foi filtrada em tecido microfibra, e posteriormente levada a estufa por 6 h a uma temperatura de 50 °C para realizar a secagem.

Após ao procedimento de secagem, a biomassa passou por moagem manual em cadinho de porcelana, e posteriormente foi peneirada com uma peneira com diâmetro da malha de 45 μm, para separação de grânulos maiores.

A biomassa resultante deste processo foi armazenada para posterior utilização no preparo das nanoesferas e do filtro microalgal.

2.6 CROMATOGRAFIA GASOSA

A Cromatografia Gasosa e Espectroscopia de Massas (CG-EM) da biomassa foi realizada através do método de Bligh e Dyer (1959), para a extração de ácidos graxos da biomassa microalgal. As especificações do equipamento utilizado e as condições de operação para a análise de ácidos graxos estão demonstradas nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Instrumentação Analítica.

Equipamento	Marca	Modelo
Cromatógrafo a gás com espectrômetro de massas	*Shimadzu*	*GCMS-QP2010 Plus*

Tabela 2. Parâmetros e condições de operação do cromatógrafo a gás.

Parâmetros	Condições
Coluna capilar	ZB- WAX (30m x 0,25mm d.i. x 0,25 μm)
Gás de arraste	Hélio
Fluxo da coluna, mL min^{-1}	1,0
Volume de injeção, μL	1,0
Modo de injeção,	*Split* (1:10)
Temperatura do injetor, °C	250
Programação da temperatura do forno	70 °C / 4 °C até 240 °C – 250 °C / 5min
Tempo total, min	49,5
Temperatura da fonte de ionização,	270 °C
Temperatura da interface, °C	260
Modo de aquisição, m/z	*Scan 35 – 500*

2.7 FLOCULAÇÃO

Para a realização deste processo, foram preparadas nanopartículas de quitosana (NQ) através do método de gelatinização iônica descrito por Calvo *et al.* (1997).

2.8 NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA (NQ)

Com base nas condições de gelatinização as NQ foram produzidas solubilizando 0,2 g de quitosana (99% de pureza, Sigma-Aldrich) em 100 mL de solução de ácido acético (0,2 mol/L) sob constante agitação por cerca de 40 min em agitador magnético. A concentração de Tripolifosfato de Sódio (TPP, fornecido pela Sigma-Aldrich, 90% de pureza) foi fixada em 0,1 g, dissolvida em 100 mL de água miliQ, sob constante agitação por cerca de 40 min (CALVO *et al.*, 1997).

Após a efetiva obtenção das nanopartículas, estas foram transferidas para tubos falcon, centrifugadas por 10 min a 3000 rpm em uma centrifuga Spinlab à temperatura ambiente. As amostras passaram por tríplice lavagem com água destilada, após ressuspensas e armazenadas em duas situações de temperaturas diferentes: ambiente refrigerado (4 °C) e temperatura ambiente (25 °C), com intuito de verificar se a temperatura influenciava na estabilidade das nanopartículas obtidas.

2.9 FLOCULAÇÃO COM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA (NQ)

A floculação utilizando a Nanoquitosana (NQ) aconteceu utilizando a NQ refrigerada e a NQ conservada a temperatura ambiente.

O processo consistiu na adição da NQ no cultivo da microalga *Spirulina maxima*, posteriormente foi realizada a filtração a vácuo para eliminação de todo o líquido, secagem em estufa e moagem manual com posterior peneiração.

No cultivo floculado com a NQ a temperatura ambiente, foi utilizado em torno de 30 mL de floculante, sendo o mais vantajoso em comparação a floculação com a NQ refrigerada onde foi necessário 200 mL de floculante para obter o mesmo rendimento de massa seca do cultivo.

2.10 PRODUÇÃO DE NANOESFERAS

A biomassa de *Spirulina maxima* (nanoesfera 1), adquirida comercialmente através da Farmácia de Manipulação Mais Viva Pharma, lote: 037915, Fabricante: Wudi LVQI BIOLOGICAL, com procedência da China e prazo de validade: 17/02/2022, foi produzida e adaptada através da metodologia descrita por Fessi et al. (1989), Reis *et al*. (2006), Mora-Huertas *et al*. (2010) e Rao e Geckeler (2011).

Para a fase orgânica, em um becker adicionou-se 1 g de PCL (Policaprolactona Mn 80000 - Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) em 268 mL de acetona, permanecendo durante 1h em agitação em temperatura de 40 °C. Em outro becker a fase aquosa foi composta por 1 g de biomassa de *Spirulina maxima* dissolvida em 536 mL de água destilada, permanecendo em agitação por 1h a temperatura ambiente. Passado o tempo de agitação, a fase orgânica foi vertida lentamente na fase aquosa sob agitação durante 15 min, provocando uma difusão rápida do solvente e levando à formação instantânea de uma suspensão coloidal. Após esse tempo a suspensão foi submetida a evaporação do solvente em rotaevaporador por um tempo médio de 6 h, ocorrendo a formação da nanoesfera.

A produção da nanoesfera 2 (microalga cultivada em laboratório em sistema fechado, utilizando a NQ em temperatura ambiente como floculante), seguiu o mesmo protocolo de preparação da nanoesfera 1, com as mesmas adaptações requeridas no preparo na nanoesfera 1. Estas adaptações foram necessárias pois para o preparo da nanoesfera não há necessidade de introduzir óleo e tensoativos sintéticos, pois a biomassa microalgal já os contém.

2.11 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOESFERAS

Para realização do potencial zeta, diâmetro médio e índice de polidispersão foi utilizada a técnica de espalhamento de luz dinâmico através do equipamento Zetasizer (Zetasizer® nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvern), do laboratório de Nanotecnologia da Universidade Franciscana.

O pH foi obtido diretamente nas formulações com auxílio de um potenciômetro devidamente calibrado (DM-22, Digimed®).

Com os resultados das caracterizações obtidos, aplicou-se tratamento estatístico, com média ± DP, seguido de teste variância de uma via e *post hoc* de Tukey. O programa estatístico GraphPad Prism, versão 7, foi utilizado. Foram considerados significativos os resultados com $p<0,05$.

2.12 LIOFILIZAÇÃO DA NANOESFERA

Para a secagem das amostras (Liofilizador Terroni LH 2000/3), utilizou-se uma amostra de 50 mL da nanoesfera 2, utilizando biomassa floculada com NQ em temperatura ambiente. O processo ocorreu durante 24/h, em 3 ciclos de 8/h, a uma temperatura de -5 ºC, resultando em 7 g de nanoesfera liofilizada.

2.13 PRODUÇÃO DO FILTRO ATRAVÉS DO *ELETROSPINNING*

Para a produção do filtro foram utilizadas as metodologias, segundo os autores Augustine *et al*. (2014) e Zapata *et al*. (2011).

Foi utilizado o polímero poli-ε-caprolactona considerado biocompatível e com degradação lenta em comparação a outros polímeros. Para a produção da fibra, o polímero foi dissolvido em acetona e após foi adicionado a nanoesfera 2. Na sequência foram realizadas alterações no método como, o uso de duas agulhas, variando-se o calibre (diâmetro) da agulha expresso na unidade Gauge (G) (18 G e 22 G), e a posição do coletor (horizontal e vertical). Em um becker foi adicionado 15 mL de acetona e 1,0 g de PCL, que permaneceram em agitação por 40 min a 50 °C. Passado este tempo, esta mesma composição foi colocada em um agitador, e adicionado 0,060 g de nanoesfera 2, onde permaneceu em agitação por mais 2 minutos de modo que houvesse a homogeneização completa da mistura.

Em seguida o fluido polimérico foi inserido no tubo capilar (seringa de 10 mL) e os terminais elétricos foram ligados na ponta da agulha (22 G) e no coletor na posição horizontal para a realização da primeira técnica, onde a diferença de potencial pela fonte foi induzida.

Foi usado uma diferença de potencial de 15 W, voltagem de 6 kW, com rotação do aparelho em 530 rotações/s, pelo tempo de 1 hora, sendo liberado 1 mL por minuto

em temperatura em torno de 22 ºC, obtendo um filtro retangular com tamanho maior em comprimento (20 cm).

Para a confecção de um segundo filtro, foi utilizado o coletor deixado na posição vertical, obtendo-se um filtro cilíndrico, com um maior diâmetro. Em um becker de 50 mL, foi adicionado 15 mL de Acetona e 0,75 g de PCL. Esta composição foi colocada em agitação com temperatura de 50 °C a um tempo de 35 minutos. Passado este tempo, esta mesma composição foi colocada em agitação e adicionado 0,037 g de nanoesfera 2 onde permaneceu em agitação por mais 2 minutos de modo que houvesse a homogeneização completa da mistura.

Em seguida o fluido polimérico foi inserido no tubo capilar (seringa de 10 mL) e os terminais elétricos foram ligados na ponta da agulha de aço inoxidável com ponta 18 G (diâmetros interno e externo de 0,84 mm e 1,27 mm) respectivamente, e no coletor, finalizando é induzida a diferença de potencial pela fonte. Foi utilizada uma potência de 15 W, com rotação do aparelho em 530 rotações/s, pelo tempo de 1 hora, sendo liberado 1 mL por minuto em temperatura em torno de 22 ºC.

Através desta tensão e força aplicadas, são ejetadas gotículas que vão sendo depositadas no coletor dando forma aos filtros acima elencados.

A distância utilizada para a produção dos filtros em questão foi de 10 cm, e segundo a literatura preconizada por Kumar *et al*. (2014), esta distância pode variar entre 10 e 25 cm.

2.14 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A morfologia das fibras foi analisada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV – JEOL, JSM 6060) e o diâmetro das fibras foi avaliado com o aplicativo *Image J.*

Foi utilizado Microscópio eletrônico de varredura (MEV), pertencente ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria, modelo sigma 300 VP (Carl Zeiss, Inglaterra) com filamento de emissão por campo (FEG- Fiels Emission Gun) do tipo Schotky (filamento de tungstênio recoberto com óxido de zircônio), equipado com coluna Gemini (Zeiss, Inglaterra). As imagens foram obtidas com uso do detector secundário (SE2) no modo alto vácuo ($1x10^{-9}$ bar), energia de 1 KV, distância de trabalho de 4,5 mm, abertura de 20 µm.

2.15 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS FILTROS

Tendo como principal objetivo a produção de um filtro para biorremediação de águas residuais, foi produzido um filtro piloto empregando uma garrafa pet utilizando a metodologia descrita por Mothé *et al*. (2020). Cortou-se a parte superior (maior diâmetro) da garrafa pet de 600 mL e foi adicionado filtro (18 G ou 22 G), algodão, carvão, areia fina, brita e gaze, conforme a figura 1.

Figura 1: Filtro caseiro com garrafa pet invertida

Fonte: construção do autor

As amostras de água bruta utilizadas para filtração foram coletadas em um curso d'água na estrada dos Pains na cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

Após a filtração as águas foram analisadas quanto ao pH, condutividade elétrica e avaliação microbiológica. A determinação da condutividade elétrica foi realizada com um condutivímetro acoplado a uma sonda, pH determinado por um potenciômetro e a avaliação microbiológica foi realizada pelo Laboratório Quimioambiental Eireli EPP, utilizando ensaios reconhecidos pela Rede Metrológica/RS, conforme NBR ISSO/IEC 17025:2017.

2.16 AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DA NANOESFERA E DO FILTRO MICROALGAL

2.16.1 Atividade antimicrobiana de nanoesfera de microalga *Spirulina maxima* pelo método de determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os testes de sensibilidade para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos diferentes microrganismos testados foram determinados pelo método de microdiluição em caldo de acordo com o protocolo M07-A8 aprovado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

As cepas bacterianas de *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Salmonella sp, e Shigella sp* utilizadas neste estudo são isolados clínicos de internos do Hospital Universitário de Santa Maria que foram previamente identificados por métodos fenotípicos específicos de gênero.

Esses microrganismos fazem parte do acervo de cepas do Laboratório de Microbiologia da Universidade Franciscana, Santa Maria-RS.

A CIM foi determinada para avaliar a atividade antimicrobiana da Nanoesfera produzida com a biomassa da microalga *Spirulina maxima* contra os microrganismos testados. Nesse sentido, as amostras bacterianas foram cultivadas em ágar Mueller-Hinton (MH), e as colônias foram inoculadas em 5 mL de soro fisiológico estéril, a absorbância foi controlada até obter uma transmitância de 0,5 na escala MacFarland (1 x 10^6 a 5 x 10^6 células por mL), então foi realizada uma diluição de 1:10 em caldo MH resultando em uma concentração de 104 células por mL. Após a preparação do inóculo, a CIM foi realizada em placas de poliestireno de 96 poços. Os testes foram realizados em triplicata onde, primeiramente, 100 µL de caldo MH foram distribuídos em cada poço. Uma alíquota de 100 µL da solução de Nanoesfera foi adicionada ao primeiro poço e, após homogeneização, transferida para o segundo, e assim sucessivamente até o nono poço. Feitas as diluições seriadas, obtiveram-se as seguintes diluições: 10.000, 5.000, 2.500, 1.250, 625, 312,5, 156,25, 78,12 e 39,06 μg/mL. Logo após, os microrganismos foram inoculados, onde 10 μL do inóculo padronizado foram então adicionados a cada poço da placa de microdiluição. Após a pipetagem, as placas foram incubadas a 37 ºC por 48h. As placas foram lidas adicionando 20 µL de uma solução a 1% do corante cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (Vetec®), a fim de auxiliar no desenvolvimento da CIM. Como controle negativo (-) foram utilizados três poços com o caldo MH e, como controle positivo (+), três poços com o caldo MH e o inóculo.

2.16.2 Interferência das nanoesferas contendo biomassa da microalga *Spirulina maxima* na formação de biofilme bacteriano

Para avaliar a capacidade de interferência das nanoesferas na formação do biofilme de *K. pneumoniae, E.coli, P. aeruginosa, S.aureus, Salmonella sp e Shigella sp.*, cada isolado bacteriano foi cultivado em placas de Petri estéreis com MH Agar e incubadas a 37 ºC por 24h. Em seguida, as colônias foram suspensas em solução salina 0,85% estéril para preparar o inóculo. A densidade celular foi ajustada em espectrofotômetro para obter uma transmitância equivalente ao tubo 0,5 na escala McFarland (1 x 10^6 a 5 x 10^6 células/mL) no comprimento de onda de 630 nm.

Em placas de 96 poços de poliestireno estéril, foram adicionados 90 μL de caldo brain–heart infusion (BHI) suplementado com 1% de glicose e, em seguida, 20 μL do inóculo de cada microrganismo em cada poço e 90 μL da solução de nanoesferas foram dispensados para testar a atividade antibiofilme das nanopartículas. Para o controle negativo foi adicionado apenas caldo e para o controle positivo foi adicionado o meio de cultura mais a solução contendo os microrganismos. Após a pipetagem, as placas foram incubadas a 37 ºC por 48h.

Após esse período, as amostras foram lavadas com 200 µL de água destilada, três vezes. Em seguida, o biofilme foi fixado com 150 µL de metanol por 20 min, após o esvaziamento das placas e os poços corados com 150 µL de cristal violeta por 15 min e novamente lavados com 200 µL de água destilada. Posteriormente, 150 µL de etanol 95% foi adicionado para diluir os cristais. Por fim, a DO (densidade óptica) foi determinada em leitor de microplacas, medida em 570nm (STEPANOVI et al., 2007).

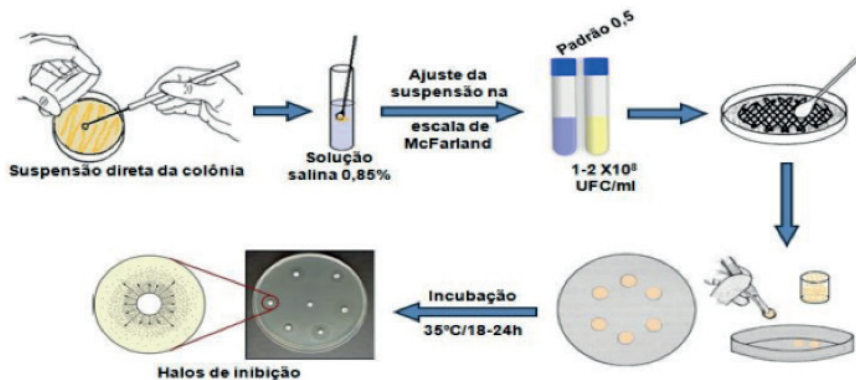
2.16.3 Avaliação da eficácia antimicrobiana dos Filtros pelo método disco-difusão

O método de disco-difusão foi idealizado por Bauer *et al.* em 1966, e desde então é um dos métodos mais utilizados nos laboratórios de microbiologia no Brasil. O princípio deste método baseia-se na difusão, através do ágar, de um antimicrobiano impregnado em um disco de papel-filtro. A difusão do antimicrobiano leva à formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano. Esse método é qualitativo, ou seja, permite classificar a amostra bacteriana em suscetível (S), intermediária (I) ou resistente (R) ao antimicrobiano (NCCLS, 2000).

As propriedades antimicrobianas do filtro microalgal com nanoesferas de microalga Spirulina maxima e filtro branco, contra as cepas bacterianas de *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Salmonella sp, e Shigella sp.* foram investigadas usando a técnica de difusão em disco padrão. As cepas bacterianas utilizadas neste estudo são isolados clínicos de internos do Hospital Universitário de Santa Maria que foram previamente identificados por métodos fenotípicos específicos de gênero. Esses microrganismos fazem parte do acervo de cepas do Laboratório de Microbiologia da Universidade Franciscana, Santa Maria - RS.

A metodologia de disco-difusão foi realizada de acordo com as instruções do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS). Resumidamente consegue-se observar conforme a Figura 2, onde as cepas de bactérias foram subcultivadas durante 24hrs em um meio de cultura ágar Mueller Hinton. Após, com auxílio de uma alça bacteriológica foram colhidas algumas colônias bacterianas, com a mesma morfologia da placa de cultura fresca, e suspendidas em 5ml de salina estéril a fim de se obter uma turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland. Após a homogeneização do inóculo, foi introduzido um *swab* estéril dentro do tubo, e em seguida este foi comprimido contra a parede do tubo para a remoção do excesso de líquido. A inoculação foi feita em forma de estrias na superfície do ágar em três direções, girando a placa em ângulo de 60° após cada estria. Antes da aplicação dos filtros, as placas semeadas foram deixadas em cima da bancada por aproximadamente cinco minutos, para permitir que o excesso de umidade da superfície do ágar fosse absorvido. A aplicação dos filtros foi feita com auxílio de uma pinça estéril para evitar contaminação. Todos os discos foram pressionados

suavemente para o contato total com a superfície do ágar. As distâncias de 30 mm entre um disco e outro (centro a centro dos discos) e de 15 mm da margem da placa foram mantidas, impedindo a superposição dos halos de inibição. Após 24h de incubação, as placas foram examinadas para verificar se o crescimento obtido estava uniforme, se existia presença de contaminantes e se o diâmetro do halo de inibição estava bem definido.

Figura 2: Montagem do teste de disco difusão

Fonte: AGUIAR (2014)

RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 MEIOS DE CULTURA

Após a realização de cultivos de microalgas com diferentes meios de cultura, verificou-se que o meio BG 11 foi o que apresentou uma melhor resposta aos parâmetros avaliados, como pH na faixa de 9,3 e densidade óptica, estando de acordo com estudos de Miller e Colman (1980), onde este tipo de microalga assimila preferencialmente a forma bicarbonato. Portanto, segundo o autor, o pH ideal de cultivo é aquele em que haja deslocamento químico no sentido da formação do bicarbonato.

3.2 MÉTODOS DE RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA

A escolha pela filtração com tecido se deu principalmente pela sua resistência ao vácuo e a lavagens frequentes, não rasga, não encolhe, não se deforma, não perde propriedades, só vai desgastando com o uso diário. Tem uma alta durabilidade e uma grande capacidade de reuso, ou seja, não há o desperdício com descarte de cada filtração como acontece com o filtro de papel (DIAS, 2021).

O método de secagem por estufa a 50 °C foi escolhido, pois era preciso a biomassa com maior quantidade em peso seco (1 g). Já o método de secagem por liofilização garante maior estabilidade quando relacionado aos lipídios produzidos, mas também pode romper as células e desestabilizar os lipídios durante o congelamento (CHEN *et al*., 2015).

3.3 CROMATOGRAFIA

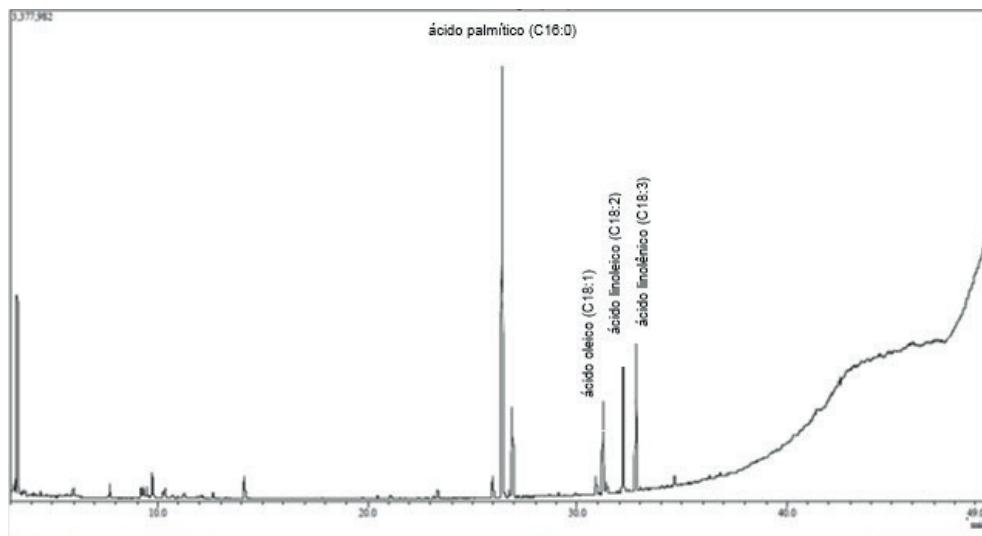
Foi realizada Cromatografia Gasosa com detector de massas (GC-MS), caracterizando os ácidos graxos da biomassa extraída da microalga *Spirulina maxima* pelo método de Bligh e Dyer (1959).

Este método, tem-se mostrado promissor quando aplicado à biomassa microalgal, especialmente por permitir trabalhar com elevados teores de umidade e pouca quantidade de biomassa (BLIGH; DYER, 1959).

De acordo com Bligh e Dyer (1959), as misturas de clorofórmio e metanol têm uma ampla utilização como extratores lipídicos. Conforme os autores, uma ótima extração lipídica resulta quando o tecido é homogeneizado com uma mistura de clorofórmio e metanol que, ao se misturar com a água contida no tecido, resulta em uma solução monofásica e o homogeneizado resultante poderia ser diluído com água e/ou clorofórmio, produzindo um sistema bifásico.

A composição lipídica da biomassa microalgal é composta especialmente por glicerol, açúcares ou bases esterificadas e ácidos graxos contendo entre 12 e 22 carbonos, podendo ser tanto saturados, quanto mono ou poli-insaturados e tem se apresentado como biossurfactantes ativos (BECKER, 2004).

Na figura 2, está demonstrada a caracterização cromatográfica da biomassa, onde revela ácidos graxos predominantes: ácido palmítico (C16:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) e o ácido linolênico (C18:3).

Figura 3: Caracterização cromatográfica da biomassa *Spirulina maxima*

Fonte: Cromatografia Gasosa e Espectroscopia de Massas

Os resultados aqui demonstrados corroboram com os achados de outros trabalhos da literatura, inclusive demonstrando o ácido palmítico como constituinte majoritário da biomassa de *Spirulina maxima* (COLLA *et al*., 2004; DESHNIUM *et al.,* 2000; OLGUÍN *et al*., 2001).

Os ácidos graxos são importantes componentes da matéria orgânica das microalgas, em geral são encontrados na forma de triglicerídeos, que por transesterificação produzem mono ésteres de ácidos graxos, produzidos principalmente por álcoois de cadeia curta (etanol ou metanol) catalisada por ácidos, bases ou enzimas. Os ácidos graxos tais como: o ácido palmítico, ácido oleico e os ácidos graxos considerados essenciais como: linoleico, linolênico são encontrados em microalgas do tipo *Spirulina maxima* (FELLER *et al*., 2015), corroborando com os achados encontrados neste presente trabalho.

Dentro deste contexto de biorremediação ambiental, muitos estudos vêm enaltecendo o papel dos biossurfactantes, por possuírem alto potencial de aplicação ambiental devido às suas características específicas como biodegradabilidade e atoxicidade (NITSCHKE, 2002). São compostos tensoativos produzidos extracelularmente ou como parte da membrana celular de microalgas, bactérias, fungos e leveduras e apresentam características surfactantes iguais aos produzidos sinteticamente (DESAI, 1997; BANAT, 2000).

Nota-se que os achados cromatográficos da biomassa extraída do cultivo da microalga *Spirulina maxima*, revelam ácidos graxos que de acordo com a literatura demonstram papel fundamental como biossurfactantes na biorremediação ambiental. Estes achados reafirmam que a aplicação de microalgas vem sendo uma das alternativas mais eficientes, sustentáveis e economicamente viável na prevenção, controle e conservação dos ecossistemas (BECKER, 2004).

Testando a eficácia na remoção de cobre e zinco, Reck *et al*. (2018) utilizaram a cepa de *Spirulina platensis* aplicada na biorremediação de efluente piscícola de *Oreochromis niloticus* (tilápia-donilo). Para avaliação da capacidade de remoção dos metais, foram aplicadas soluções sintéticas obtidas a partir de CuSO4, para estudo do cobre, e ZnSO4 para estudo do zinco, sendo ambas as soluções preparadas com concentração de 100 mg L^{-1}. Os autores testaram em diferentes condições de pH, concentração do biossorvente (biomassa inativa) e agitação. Os ensaios apresentaram remoções de 99% para o cobre e 95% para o zinco, sendo que o único parâmetro de influência significativa foi a variação do biossorvente.

3.4 FLOCULAÇÃO COM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA (NQ)

A NQ preparada foi caracterizada e apresentava dentre os parâmetros físico-químicos: diâmetro médio e PDI de 204 nm e 1,0 respectivamente, potencial zeta de -3,20 mV e pH 2,0.

Conforme Chen *et al.* (2015), sugere-se uma homogeneidade adequada as formulações que apresentam nanopartículas monodispersas (PDI <0,3) e diâmetro menor que 300 nm. Os resultados encontrados em nosso trabalho mostra diâmetro médio da partícula adequado, porém, valor numérico de PDI equivalente a 1,0. Segundo o autor o valor de PDI varia de 0,0 (para uma amostra perfeitamente uniforme em relação ao tamanho da partícula) a 1,0 (para uma amostra altamente polidispersa com várias populações de tamanho de partícula). Valores de 0,2 e abaixo são geralmente considerados aceitáveis na prática para nanopartículas com base em polímeros de material.

Após este processo, duas alíquotas foram acondicionadas em temperaturas diferentes a fim de se verificar se a temperatura de armazenamento influenciaria na eficácia da NQ à floculação. Sendo assim foram utilizadas NQ com 14 dias de acondicionamento a 4 °C e 25 °C. Durante estes dias, caracterizações foram realizadas nos tempos 7 e 14 dias, sendo que a maior variabilidade foi encontrada na NQ refrigerada, sendo os dados representados pela média ± DP: diâmetro médio da partícula 560 nm; PDI 0,7 ± 0,28, potencial zeta 7,53 mV ± 3 mV e pH= 3,0. A NQ em temperatura ambiente se manteve sem alterações em relação ao tempo zero.

Adicionando as NQ como agentes floculantes, foram utilizadas NQ sob diferentes condições de temperatura, a fim de se obter um parâmetro de diferenciação com relação ao

volume de floculante utilizado para recuperar a biomassa cultivada, bem como avaliar se a temperatura de armazenamento influenciaria na eficácia do floculante. Sendo assim foram utilizadas NQ preparadas, após 14 dias de acondicionamento a 4 °C e 25 °C, verificou-se que a quantidade de biomassa obtida após a floculação com as duas NQ foi a mesma (1 g), porém o que variou foi a quantidade de floculante utilizado para recuperar a biomassa: NQ em temperatura ambiente floculou com 30 mL e NQ refrigerada floculou com 200 mL.

Para valores mais baixos de pH (pH=2 NQ T° ambiente), foi observada uma diminuição no tamanho médio das nanopartículas devido à interação dos $NH3^+$ da quitosana com PO_4^{3-} dos grupos presentes no TPP, no qual o tamanho das nanopartículas situam-se entre 204 nm, Potencial Zeta -3,2 mV (AZEVEDO *et al.*, 2011).

Os valores de potencial zeta mostram as mudanças na carga de superfície das nanopartículas e aumento no tamanho da NQ quando a mesmas é acondicionada a 4 °C. Os valores demonstram uma diminuição no valor do potencial zeta à medida em que o pH vai sendo aumentado, tornando o valor da carga superficial das nanopartículas mais negativo.

A presença de cargas negativas das partículas indica a redução nos valores da carga superficial das nanopartículas em decorrência da desprotonação da quitosana com a diminuição do grupo $NH3^+$ e aumento de NH2 assim como sua interação com o TPP. Uma vez que o teor de grupos $NH3^+$ diminui o reflexo da carga da superfície das nanopartículas se deve as cargas do TPP. Em relação à polidispersão, o valor numérico do PDI de 1,0 demonstra uma amostra altamente polidispersa com várias populações de tamanho de partícula (TZU-HUI *et al.*, 2008).

Devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, a quitosana tem grande potencial para aplicações na agricultura, medicina, odontologia, farmacêutica, biomédica, alimentos e tratamento de águas (LLANOS, 2014). Porém, dentre os floculantes naturais, a quitosana, por ser um composto de origem animal, tem sido amplamente utilizada, porém ela possui, em relação aos demais floculantes existentes, um custo mais elevado (R$ 80,00/kg). Diante disto, outro viés importante que o presente trabalho também trata, relaciona-se a preocupação da indústria pesqueira, no que diz respeito ao destino adequado para seus resíduos, buscando alternativas para seu aproveitamento e, desta forma, tornar a atividade aquícola sustentável e viável ecologicamente de modo que as agressões ao meio ambiente sejam cada vez mais reduzidas (SCHMUHL *et al.*, 2001).

Devido às características de biodegradabilidade, biocompatibilidade e hidrofilicidade, além do fato de que provêm de um recurso natural renovável e abundante, a quitosana têm sido largamente utilizadas em estudos com vistas ao tratamento de efluentes, sendo empregada como agente quelante de metais, como floculante, como adsorvente de corantes, adsorvente de ânions metálicos, e outras aplicações (GUIBAL *et al.*, 2001).

A utilização de quitosana isolada na forma sólida, pó ou em esferas nos processos de adsorção é muito frequente, porém, nestas formas, a quitosana apresenta desvantagens

como a baixa área superficial interna, baixa velocidade de adsorção e a solubilidade em meio ácido, que inviabilizam o processo de reutilização. Esses problemas são minimizados pela mistura do biopolímero com outros produtos que os estruturem e que possam incrementar o desempenho da quitosana como material adsorvente (LUCENA *et al.*, 2013), como o processo de formação de uma nanopartícula de quitosana.

Estudos realizados por Fonseca *et al.* (2014), investigaram a eficiência de uma solução de quitosana nanoparticulada na floculação de biomassa de microalgas *Chlorella vulgaris*, em efluente suinícola e em fotobiorreatores em escalas laboratoriais. O efeito da quitosana nanoparticulada foi comparado ao uso da quitosana na forma pura utilizando testes de jarros.

Entre as concentrações testadas (20, 30, 40 e 60 mg L^{-1}), a nanoquitosana na dose de 40 mg L^{-1} apresentou a maior recuperação de biomassa (94%), enquanto a solução de quitosana pura (30 mg L^{-1}) foi de 87%.

Além disso, a NQ apresentou maior capacidade total de recuperação de biomassa e os resultados sugeriram que as nanopartículas de quitosana podem ser uma alternativa interessante de polímero orgânico não tóxico para floculação de microalgas do tipo *Chlorella sp.*

3.5 NANOESFERAS

A partir da biomassa floculada foram preparadas as nanoesferas: Nanoesfera 1 com biomassa liofilizada de *Spirulina maxima* adquirida comercialmente, utilizada como controle para os testes subsequentes (adquirida comercialmente através da Farmácia de Manipulação Mais Viva Pharma, lote: 037915, Fabricante: Wudi LVQI BIOLOGICAL, com procedência da China e prazo de validade: 17/02/2022) e a Nanoesfera 2 (biomassa de *Spirulina maxima* floculada com NQ em temperatura ambiente).

A Nanoesfera 1, apresentou diâmetro médio de partícula e índice de polidispersão em torno de 171 nm e 0,3, respectivamente, além de um potencial zeta de aproximadamente -15,5 mV e um pH 7,5.

A Nanoesfera 2, apresentou diâmetro média de tamanho de 175,82 nm e índice de polidispersividade de 0,308 ± 0,05 respectivamente, um potencial zeta médio aproximado de -30,9 ± 2,27 mv e pH 6,7.

Os resultados da caracterização das nanoesferas sugerem homogeneidade adequada: todas as formulações devem ser monodispersas (PDI <0,3) e diâmetro menor que 300 nm (CHEN *et al.*, 2015).

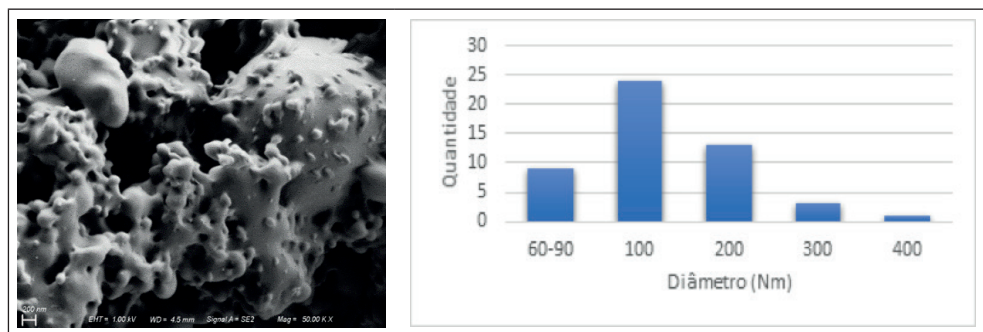
Neste estudo, o índice de polidispersidade foi baixo (<0,3) para todas as dispersões obtidas, indicando a formação de sistemas monodispersos. Não houve tendências visíveis na sedimentação, separação de fases ou agregação. O tamanho médio de partícula, PDI, potencial zeta e pH são considerados bons indicadores de estabilidade de nanopartículas

suspensas. Considerando que o potencial zeta reflete a repulsão eletrostática entre as partículas, e que o valor padrão do potencial zeta é igual ou superior a ± 30 mV, associando a soluções estáveis (BERNARDI *et al.*, 2011).

Além disso, altos valores de índice de polidispersidade indicam heterogeneidade no diâmetro das partículas suspensas; variações nos valores de polidispersidade em função do tempo indicam a formação de populações de partículas com diâmetros que não existiam inicialmente, o que pode ser devido à agregação ou quebra / degradação das partículas.

Os resultados da caracterização obtidas demonstram que as nanoesferas foram desenvolvidas com sucesso (MACHADO *et al.*, 2019).

Após o processo de caracterização das nanoesferas, a denominada com número 2 (nanoesfera 2), foi liofilizada para posterior confirmação de tamanho e morfologia por MEV (Figura 4), onde demonstrou uma maior prevalência de nanoesferas entre 100 e 200 nm, confirmando os dados da caracterização pela média de diâmetro da partícula.

Figura 4: Imagem MEV e dados obtidos com software *Image J*, para Nanoesfera 2.

Fonte: construção do autor

Os filtros produzidos por *eletrospinning* foram caracterizados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), comprovando que o diâmetro interno da agulha influencia diretamente no diâmetro das fibras produzidas. As fibras produzidas com a agulha 22 G apresentaram diâmetros que variaram em maior proporção de 100 a 300 nm e com a agulha 18 G os diâmetros variaram entre 50 a 100 nm. Os diâmetros das fibras, mesmo utilizando diferentes calibres de agulhas, resultaram em fibras com padrão nanométrico, conforme figura 5 e 6, respectivamente.

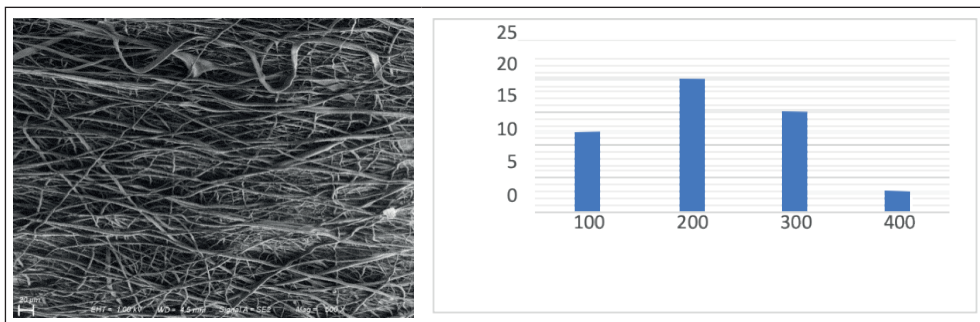
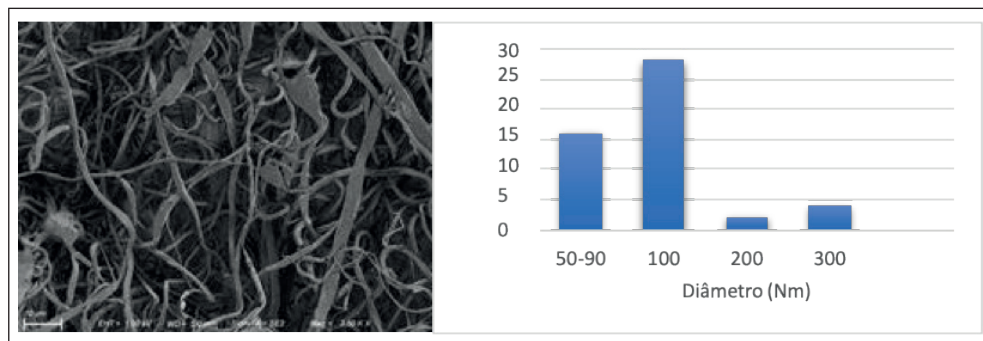
Figura 5: Imagem MEV e dados obtidos com software Image J, para o filtro com diâmetro da agulha de 22 G.

Fonte: construção do autor

Figura 6: Imagem MEV e dados obtidos com software *Image J*, para o filtro com diâmetro de agulha18 G.

Fonte: construção do autor

Estes achados estão de acordo com a literatura, no que tange a aplicação do *electrospinning*, como técnica adequada para a produção de fibras de diâmetro reduzido, além de ser uma metodologia simples e rentável, é capaz de produzir nanofibras contínuas de diversos materiais a partir de diferentes bio/polímeros para aplicações industriais (ALVES, 2008).

3.6 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS NANOFILTROS NA FILTRAGEM DE ÁGUA BRUTA

Os resultados apresentados na água bruta, sem filtragem, revelaram a presença de coliformes fecais termotolerantes e coliformes totais.

Após a realização das sucessivas filtrações, constatou-se que o filtro com diâmetro de agulha de diâmetro 22 G, foi o que apresentou maior eficiência de filtração, maior retenção de impurezas, água mais clara comparado a água bruta e a filtrada com o filtro

com diâmetro de agulha de 18 G, tendo em ambas as águas filtradas uma vazão de 5 gotas por segundo.

As amostras das águas coletadas, passaram por análise microbiológica para detecção de coliformes fecais/ termotolerantes. Após as filtrações foi detectada na amostra usando filtro com diâmetro de agulha de 22 G a ausência destes microrganismos. Os coliformes fecais/ termotolerantes diferenciam-se dos coliformes totais por fermentarem lactose com produção de gás a uma temperatura de 44,5 ± 0,2 °C em 24h. O principal representante do grupo termotolerante e o indicador mais específico de contaminação fecal e de eventual presença de organismos patogênicos é a *Escherichia coli*. A Portaria nº 1469, de 29 de dezembro de 2000, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), estabelece como padrão de potabilidade, para a água destinada ao consumo humano, ausência de bactérias do grupo dos coliformes fecais/termotolerantes.

Embora não exista limitação para o número de coliformes totais presentes na água potável, esta mesma portaria, nº 1469, de 29 de dezembro de 2000, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) sugere que, quando for verificada a presença de coliformes totais (presentes nas 3 amostras de águas avaliadas) e ausência de fecais sejam tomadas providências imediatas de caráter corretivo e preventivo.

A eficiência da filtração está relacionada com o diâmetro das fibras. Filtros preparados com fibras obtidas por *electrospinning* podem ser capazes de filtrar partículas de tamanho na faixa submicrométrica, uma vez que os canais e os elementos estruturais tenham sido preparados de acordo com a dimensão das partículas que se deseje filtrar (GRAHAM, 2002). Uma das possíveis explicações para o filtro obtido através da agulha com diâmetro 22 G, ter sido mais eficaz, a nível microbiológico, segundo Bhardwaj *et al*. (2010) e Haider *et al.* (2019), pode ter sido a vazão da solução polimérica, pela agulha com diâmetro de 18 G, pois influencia o tamanho da gota, a velocidade do jato e a taxa de transferência de material, exercendo grande influência no diâmetro e morfologia das fibras. Uma vazão ideal, depende das propriedades do sistema polímero/solvente e dos demais parâmetros de processo, como, estabilização do jato para a obtenção de fibras homogêneas. Taxas de ejeção muito baixas levam à formação de fibras não uniformes, pois não há transferência de material suficiente.

O filtro 22 G atendeu a esta expectativa, sendo considerado o melhor com relação a eficiência de filtração, pois conseguiu filtrar a maior parte dos microrganismos presentes na amostra de água e também conseguiu manter sua integridade física após as filtrações, ao contrário do filtro 18 G que se decompôs durante as filtrações.

Foram realizadas avaliações de condutividade elétrica onde os valores representativos de potabilidade determinados pela literatura são de 50 a 200 μS/cm (microsiemens por centímetro), ou seja, apresentam concentrações baixas de sais dissolvidos (PEIXOTO *et al*., 2016).

Para o 22 G o valor de condutividade foi de 113,93 μS/cm e para o filtro de 18 G de 113,62 μs/cm. O valor da condutividade depende da concentração dos íons presentes na amostra. Portanto quanto maior a condutividade, maior é o teor de impureza da amostra. Comparando com os valores aceitáveis que são para as águas naturais teores de condutividade na faixa de 10 a 100 µS/cm e ambientes poluídos por esgotos domésticos, agrotóxicos ou industriais os valores podem chegar até 1412 μS/cm, as amostras analisadas estão de acordo com os parâmetros aceitáveis sendo consideradas potáveis (PEIXOTO *et al.*, 2016).

Para o pH (potencial hidrogeniônico) as amostras apresentaram os seguintes resultados: 6,45 (água bruta), 7,14 (Filtro 22 G) e 6,84 (Filtro 18 G).

A acidez depende do pH, pois é devida ao CO2, que estará presente somente para valores de pH inferiores a 8,3 e superiores a 4,4, pois, abaixo deste, a acidez decorre da existência de ácidos fortes, que não costumam estar presentes nas águas.

Há interesse em se conhecer a acidez pois o condicionamento final da água em uma estação de tratamento pode exigir a adição de alcalinizantes para manter a estabilidade do carbonato de cálcio e evitar problemas relacionados à corrosão dos constituintes de um sistema de abastecimento de água. A acidez é expressa em valores de pH, com CaCO3 se faz a determinação de pH e pode ser determinada com adição de uma base para neutralizar o CO2 presente, utilizando-se da fenolftaleína como indicador, pois esta altera sua coloração no valor de pH = 8,3 (DI BERNARDO, 1993).

Após avaliações realizadas com as amostras de água bruta, constatou-se a eficiência do filtro de 22 G, na purificação destas. Deve-se considerar que os resultados obtidos são prévios e a purificação da amostra não passou por todas as fases de tratamento, mesmo assim, o filtro de 22 G apresentou índices de Potabilidades ideais segundo a Portaria n º 2.914 (BRASIL, 2011).

3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE UMA NANOESFERA CONTENO BIOMASSA DE MICROALGA PELO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

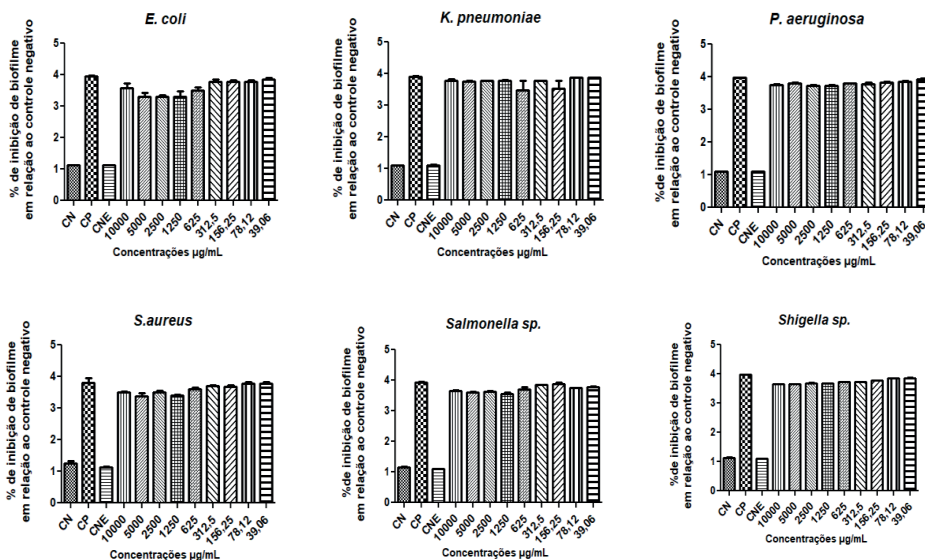
Os resultados (tabela 3) demonstraram que a solução de nanoesferas não apresentou atividade antimicrobiana *in vitro* contra nenhum dos microrganismos testados, não sendo observados efeitos no crescimento das bactérias.

Tabela 3: Resultados do teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) da nanoesfera contendo microalga *Spirulina maxima*.

Microrganismos	CIM (µg/mL)
Escherichia coli	---
Staphylococcus aureus	---
Salmonella sp	---
Shigella sp	---

3.8 AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DAS NANOESFERAS CONTENDO BIOMASSA DA MICROALGA *SPIRULINA MAXIMA* NA FORMAÇÃO DE BIOFILME BACTERIANO

A formação de biofilme para *K. pneumoniae, E.coli, P. aeruginosa, S.aureus, Salmonella sp* e *Shigella sp*., não foi estatisticamente significativa quando comparadas ao CP, conforme observado na Figura 7. As nanoesferas não foram capazes de interferir na formação de biofilme das bactérias testadas.

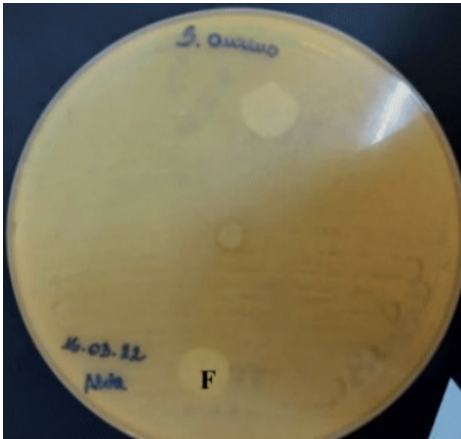
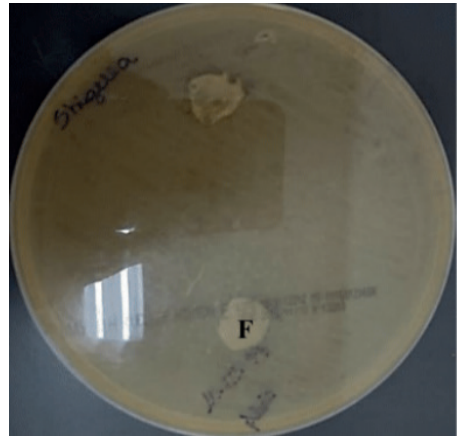
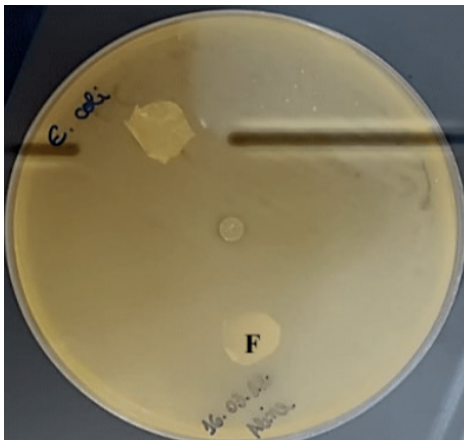
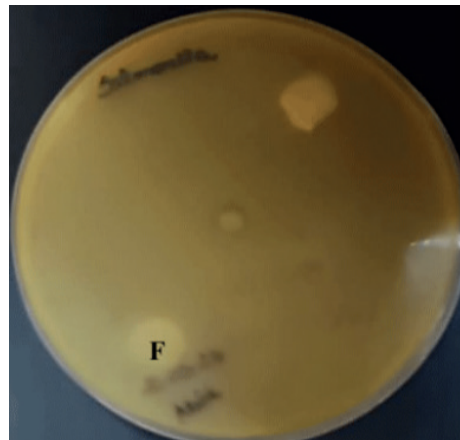
Figura 7: Efeito de diferentes concentrações de nanoesferas na inibição do biofilme de diferentes microrganismos. Diferença significativa entre a concentração testada e o controle positivo (CP). Valores com p<0,05 foram considerados estatisticamente significantes. CP: controle positivo; CN: controle negativo; CNE: controle nanoesferas.

3.9 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA NANOESFERA CONTENDO BIOMASSA DE MICROALGA

A figura 8 mostra a eficácia antibacteriana da nanoesfera contendo biomassa de microalga, testada contra várias bactérias patogênicas, *Shigella* (bactérias Gram-negativas), *Salmonela* (bactérias Gram-negativas), *Escherichia coli* (bactérias Gram-negativas) e *Staphylococcus aureus* (bactérias Gram-positivas) usando o teste de difusão em ágar.

Para melhor comparação, em uma placa de ágar sólido, o disco em branco (controle) foi colocado ao lado da amostra de nanoesfera. O diâmetro das zonas de inibição, formadas em torno de cada disco, foi determinado. Os resultados mostram que os filtros não apresentaram atividade antibacteriana, não havendo zonas de inibição.

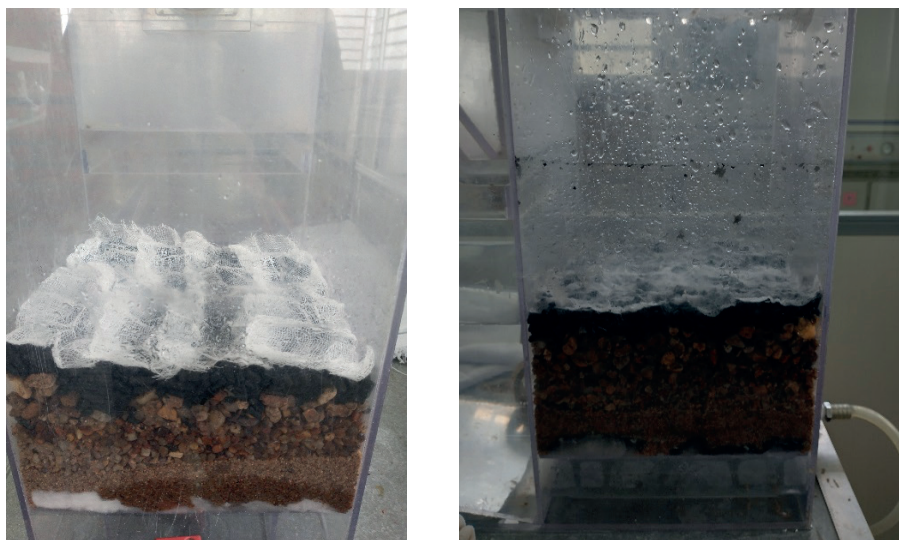
Parisi *et al*. (2009), avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato fenólico obtido a partir da microalga *Spirulina platensis* frente aos microrganismos *E. coli* e *S. aureus*. Os resultados demonstraram que os compostos fenólicos presentes na *Spirulina* tiveram alta capacidade de inibição para o *S. aureus*, bactéria Gram-positiva, formando halos de inibição de 19 a 22 mm (concentração de 47,46 mg/mL). Além disso, os resultados descritos por Parasi *et al.* não demonstram nenhuma inibição para as bactérias Gram-negativas, como a *Escherichia coli*, o que corrobora com nossos resultados.

A ausência de atividade inibitória da nanoesfera sobre as bactérias Gram- positivas pode estar relacionada à concentração de *Spirulina* utilizada em nosso estudo, que é inferior a concentração descrita na literatura com atividade antibacteriana (PARISI *et al*., 2009; KAUSHIK e CHAUHAN, 2008). Já a ausência de atividade das nanoesferas sobre as bactérias Gram-negativas pode estar relacionada com as diferenças estruturais que estas bactérias apresentam em relação às Gram-positivas, como a presença de uma membrana externa sobre uma camada delgada de peptideoglicano, presença de cápsula ou membrana interna e porinas (KONEMAN *et al.,* 1999), que podem estar dificultando a ação dos componentes bioativos da nanoesfera em estudo.

Figura 8: Atividade antibacteriana da nanoesfera contendo biomassa de microalga contra cepas patogênicas de *Staphylococcus aureus, Shigella sp., Escherichia coli* e *Salmonella sp.*

** FB: Filtro Branco

3.10 Caracterização dos nanofiltros através da realização de filtração lenta, Difratograma de Raio X e Análise de molhabilidade utilizando a técnica de ângulo de contato

Realizou-se a avaliação de filtração de um filtro lento em escala laboratorial tendo como meio filtrante: gaze, carvão, cascalho grosso, cascalho fino, areia fina, algodão e na saída de água o Nanofiltro, conforme figura 9.

Figura 9: Estrutura do Filtro Lento

Fonte: Construção do autor

Visando o tratamento de água, foram utilizados materiais simples e de baixo custo de fácil obtenção no mercado. O filtro lento foi construído utilizando uma estrutura acrílica com área de 20x20 cm, sendo os materiais dispostos no seu interior em camadas.

Na saída da água do sistema de tratamento para o reservatório, foi adicionado o Nanofiltro, a fim de finalizar a filtração da água, conforme figura 10.

Figura 10: Reservatório com Nanofiltro na saída de água

Fonte: Construção do autor

Foram realizadas duas metodologias:

A primeira metodologia constou de uma filtração sem a utilização do nanofiltro na saída para o reservatório. Foi estimada a quantidade de 20 L de água a ser filtrada, armazenada em um Barrilete. Este processo levou um tempo de 5 minutos e 19 segundos.

A água resultante desta filtração possuía coloração escura, conforme figura 11 e após aferição resultou em um valor de pH igual a 5,0.

Figura 11: Água resultante de filtração sem Nanofiltro

Fonte: Construção do autor

A segunda metodologia constou da filtração com a utilização do Nanofiltro na saída para o reservatório. Foi estimada a quantidade de 20 L de água a ser filtrada, armazenada em um Barrilete. Este processo levou um tempo de 9 minutos e 45 segundos.

A água resultante desta filtração saiu com coloração clara, conforme figura 12 e após aferição resultou em um valor de pH igual a 5,0, comprovando que o uso do nanofiltro para filtração da água não alterou o parâmetro de pH mas alterou a coloração, ou seja, houve uma visível remoção de partículas e agregados que podem influenciar nos índices de potabilidade.

Figura 12: Água resultante de filtração com Nanofiltro

Fonte: Construção do autor

Quando observada estrutura do nanofiltro após as sucessivas filtrações, percebe-se que sua estrutura física se manteve integra e os resíduos e poluentes presentes na água ficaram retidos na sua estrutura, conforme figura 13. As atividades de filtração foram realizadas nas dependências do Laboratório de Engenharia Ambiental da Universidade Franciscana.

Figura 13: Estrutura do Nanofiltro após sucessivas filtrações

Fonte: Cosntrução do autor

Os ecossistemas sempre estão sujeitos a impactos provocados pela variação de pH da água “in natura” e água tratada pela filtração lenta. Muitas bactérias não proliferam em níveis de pH baixo de 4,0 ou acima de 9,5, sendo geralmente o pH considerado ótimo entre 6,0 e 9,5. Uma água com um pH baixo (abaixo de 7) considera-se ácida. No entanto, é possível encontrar no mercado águas que rondam o pH de 5,7 ou até mais de 6. A água alcalina é também uma fonte de cálcio, magnésio e potássio, todos eles, minerais alcalinos, necessários ao organismo (CONAMA, 2005).

A turbidez da água é geralmente causada pela presença de partículas em suspensão e colóides, derivados de argila, lama, matéria orgânica e outros microrganismos. No caso das técnicas realizadas, a turbidez foi avaliada somente a olho nu.

Pode-se perceber que tonalidade da água “in natura” em relação á água pós filtração lenta com a presença do nanofiltro apresentou mudança na cor, ou seja, a tonalidade escura da filtração normal deu espaço a coloração clara da filtração com Nanofiltro.

Outro dado de extrema relevância, é que a estrutura do nanofiltro, após sucessivas filtrações (20 L) se manteve intacta, ou seja não houve alteração estrutural nem deformações no produto.

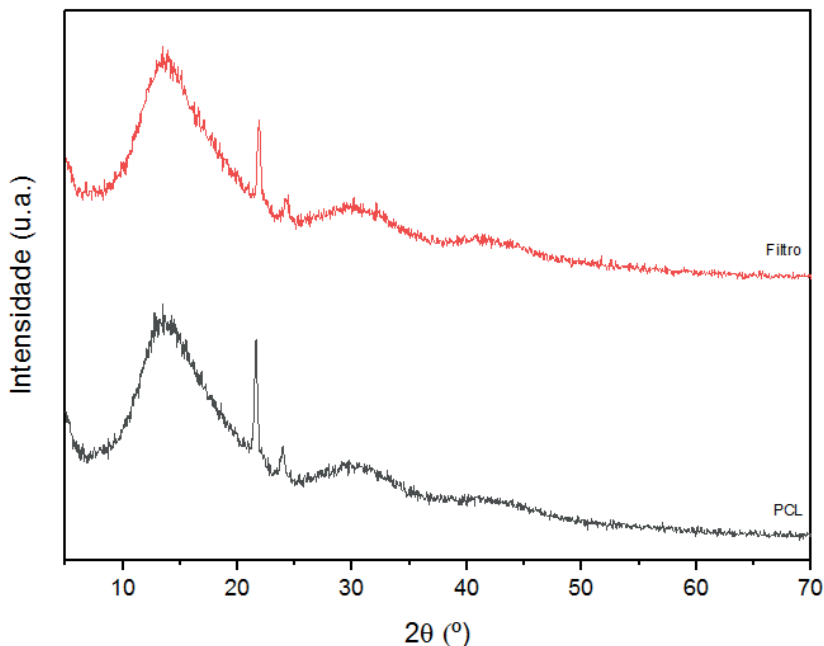
O sistema avaliado mostrou-se com potencial para a utilização no tratamento de água com médios volumes de água.

Para a produção da fibra, o polímero foi dissolvido em acetona, por seguinte adicionado a biomassa microalgal de *Spirulina maxima* e na sequência foram realizadas alterações no método como, o uso de duas agulhas, variando-se o calibre (largura) da agulha expresso na unidade Gauge (G) (18 G e 22 G). Os filtros produzidos foram caracterizados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), comprovando que o diâmetro interno da agulha influencia diretamente no diâmetro das fibras produzidas. Foi também realizada caracterização pela técnica de DRX, utilizando-se os dois nanofiltros produzidos através da técnica por *eletrospinning*. O Branco onde está presente na sua composição o polímero PCL e outro produzido com a Nanoesfera com nanoquitosana.

Os diâmetros das fibras, mesmo utilizando diferentes calibres de agulhas, através da técnica de *eletrospinning*, resultaram em fibras com padrão nanométrico. As fibras produzidas com a agulha 22 G apresentaram, após caracterização por MEV, diâmetros que variavam entre 100 a 400 nm e com a agulha 18 G os diâmetros variaram entre 50 a 300 nm.

Para realização da caracterização por DRX foram utilizados os dois filtros produzidos. Primeiramente o nanofiltro Branco somente com o PCL na sua composição, que apresentou comportamento com picos característicos em 21,6° e 23,8°, representando os planos cristalinos (110) e (200). Esses picos característicos foram citados por Kumar *et al.* (2017), representando os planos (110) e (200) respectivamente. Já quando observados valores do DRX no nanofiltro produzido com nanoquitosana, os picos característicos estão em 21,8° e 24,2°, representando os planos cristalinos (110) e (2000).

Os resultados apresentados através do difratograma de RX do nanofiltro na figura 14, apresentou picos típicos de material semicristalino onde há presença de quitosana e corrobora com Luo *et al.*(2011) e Lima (2010).

Figura 14: Difratograma de Raio X (DRX)

Fonte: Origin Lab

O ângulo de contato é a capacidade de molhamento da amostra, onde se considera o ângulo de contato entre a gota e a superfície em que está depositada, onde em superfícies hidrofílicas o q<90º, hidrofóbicas 90º <q<150º e para superfícies super hidrofóbicas um q>150º (GENNES, 1985).

A molhabilidade das nanofibras foi avaliada via medida do ângulo de contato sendo realizada com uma gota de aproximadamente 10 μL de água deionizada gotejada na superfície do filtro, e então o ângulo foi medido pelo pelo programa Angulus.

A hidrofobicidade do sistema é um parâmetro considerado importante e pode ser medida pelo ângulo de contato de gotículas de água depositadas na superfície dos copolímeros (Tabela 4).

Quando o ângulo de contato tende a zero, o espalhamento é completo, ou seja, o molhamento é total; quando o ângulo é maior que 90º, não ocorre espalhamento do líquido; por fim, se o ângulo for menor que 90º, há molhamento e o líquido se espalha espontaneamente. (LUZ *et. al.*, 2008).

Ambas as amostras são predominantemente hidrofóbicas, pois apresentam um ângulo de contato maior do que 90º (LUZ *et. al.,* 2008).

A amostra Branco (B) apresentou um ângulo médio de 98.5° no tempo 0 e um ângulo médio de 105.7° no tempo após 1 minuto, já a amostra Bio mostrou um ângulo médio de 103.5 ° no tempo 0 e um ângulo médio de 111.2° no tempo após 1 minuto. A propriedade hidrofóbica encontrada no material é uma característica presente no PCL (LUZ *et. al.,* 2008).

Tabela 4: Ângulo de contato de gotículas de água depositadas na superfície dos copolímeros

Branco (B)	Tempo 0	Tempo 1 min	Bio	Tempo 0	Tempo 1 min
B1	91.6 °	98.1°	B1	98.9 °	106.7 °
B2	96.3 °	108.0°	B2	105.9 °	110.9 °
B3	107.6°	111.2 °	B3	105.9 °	116.2 °
MÉDIA	**98.5°**	**105.7 °**	MÉDIA	**103.5 °**	**111.2 °**

3.11 ANÁLISE DE PORCENTAGEM SARS-COV2 PRESENTE NA ÁGUA RETIDO NO NANOFILTRO APÓS FILTRAÇÃO

No mês de Março de 2020, o mundo começou a sofrer uma das piores pandemias da história, causada pelo vírus SARS-COV-2 (Síndrome Respiratória Aguda Grave do Coronavírus 2), que foi inicialmente descoberto em Dezembro de 2019, na cidade de Wuhan, na China (ROLLEMBERG *et al*., 2020; BEZERRA *et al*., 2020). Vírus desse gênero acometiam apenas animais, como uma doença respiratória. Entretanto, devido a mutações, passou a infectar humanos e rapidamente tomou proporção mundial, sendo classificada como pandemia de acordo com a Organização Mundial da Saúde.

A pandemia global da doença atingiu 116 milhões de casos e 2,5 milhões de mortes relatadas globalmente desde o seu início, de acordo com OMS (2021) relatório semanal de 07 de março de 2021. Apesar do modo primário de transmissão do SARS-CoV-2 ser através de gotículas respiratórias e contato direto/indireto, a transmissão secundária por meio de águas residuais é uma grande preocupação a ser superada (LIU *et al*., 2020).

Tem sido relatada a capacidade de persistência do novo RNA SARS-CoV-2 do coronavírus por vários dias em águas residuais sem degradação considerável (AHMED *et al*., 2020).

O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA de fita simples (POLO *et al*., 2020), que causa a síndrome respiratória produzindo certos sintomas, como, febre, tosse, falta de ar, danos aos sistemas respiratório, hepático, neurológico e até a morte em alguns casos (KHAN e YADAV 2020; WONG *et al*., 2019).

Os patógenos emergentes, incluindo o SARS-CoV-2, podem entrar nos sistemas de águas residuais de diferentes fontes, como efluentes hospitalares, esgotos domésticos,

escoamento de águas superficiais, e podem apresentar sérias consequências à saúde humana (LAGHRIB *et al*., 2021). Os métodos atuais usados para remoção de vírus incluem filtração por membrana, osmose reversa, nanofiltração e adsorção, juntamente com inativação física como luz ultravioleta, oxidação fotodinâmica e desinfecção química – cloro ou ozônio (MI *et al*., 2020).

Além disso, dentre os métodos aplicados para remoção de vírus, a desinfecção química com cloro ou ozônio apresenta algumas restrições de uso atualmente considerando os subprodutos gerados, uma vez que reage com compostos presentes em águas superficiais como ácidos húmicos e fúlvicos e assim gerando potabilidade subprodutos da desinfecção da água (DBPs) como haloacetonitrilas, ácidos haloacéticos e trihalometano (GOSWAMI e PUGAZHENTHI, 2020).

As tecnologias com filtração por membranas são eficientes na remoção de vírus, apresentam limitações quanto aos custos operacionais, fato que pode limitar o uso em países de baixa renda (ADELODUN *et al*., 2020). Para obter a remoção completa do SARS-CoV-2 das águas residuais, estudos anteriores recomendavam a aplicação de tecnologias avançadas e/ou sistemas de tratamento híbridos para obter uma desinfecção satisfatória, juntamente com a remoção de metabólitos secundários produzidos por medicamentos antivirais (LUZ *et. al.,* 2008).

Estudos em nível nanométrico aparecem como uma das principais soluções tecnológicas atualmente, podendo ser aplicados em diversas áreas, apresentando inúmeros resultados satisfatórios. Tal tecnologia se fundamenta no estudo e desenvolvimento de técnicas e de ferramentas adequadas para posicionar átomos e moléculas em locais previamente estabelecidos, de maneira a obter estruturas e materiais de interesse. Diante disso, a nanotecnologia aparece como uma ótima alternativa para encontrar soluções para os problemas referentes ao tratamento de água, com técnicas mais avançadas de filtração com membranas contendo fibras com diâmetro nanométrico, mostrando desempenho superior ao tratamento e remoção de contaminantes químicos e biológicos em sistemas convencionais (PIANTA *et al*., 1998).

Países que não possuem sistemas eficientes de remoção de patógenos podem representar um alto risco de contaminação à população (BHOWMICK *et al*., 2020) e o caminho e a taxa de degradação do vírus podem variar dependendo da tubulação, do emprego da fossa séptica e do tamanho da bacia hidrográfica (POLO *et al*., 2020).

Os parâmetros microbiológicos revelam o filtro como potencial de aplicação em processos de biorremediação de água incluindo a descontaminação parcial, com diminuição da carga viral, do vírus SARS-CoV-2.

3.11.1 Obtenção de SARS-CoV-2

O vírus SARS-CoV-2 inativado usado como controle positivo foi obtido de isolado clínico em cultura de células VERO-E6 (fibroblastos de rim de macaco) (SARS-CoV-2/SP02/human2020/Br, GenBank accession number MT126808.1). Este vírus foi gentilmente cedido à Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) pelo Prof. Dr. Edison Luiz Durigon do Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP), Brasil, seguida de protocolo de manutenção e cultivo, Segundo Dorlass *et al*. (2020).

3.11.2 Ensaio de remoção viral

Para este ensaio, 250 mL de água contaminada com o vírus SARS-CoV-2 foram utilizados para a filtragem em cada filtro utilizado. Este processo de filtragem foi repetido três vezes por filtro e ao final de cada filtragem uma alíquota de água (1 mL) era retirada para posteriormente ser realizada a extração de material genético viral. Foram utilizados nas filtrações Nanofiltro Branco (F1, F3 e F5) e Nanofiltro com biomassa da microalga *Spirulina maxima (*F2, F4 e F6).

3.11.3 Extração de RNA viral

Após a realização das filtrações, cada filtro foi transferido para um novo microtubo e o RNA viral foi extraído. O Reagente TRIzol (Invitrogen) foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante.

Após a coleta, os RNAs foram quantificados em NanoDrop™ (Thermo Scientific, Waltham, MA). Uma concentração de aproximadamente 10 ng de RNA foi usada para realizar RT-qPCR.

3.11.4 RT-qPCR

O primer e a sonda usados nas reações de PCR foram projetados de acordo com as sequências publicadas pelos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, 2020).

Resumidamente, foram utilizados os Kits SARS-CoV-2 N1+N2 (Qiagen) com um volume final de 20 µL, para os quais foram adicionados os seguintes volumes à mistura para 1x: 4 µL de amostras de RNA, 1 µL 2x RT-PCR, 0,8 µL 25x enzima RT-PCR, 0,8 µL Primer 2019-nCoV_N1-F (GACCCCAAAATCAGC GAAAT), 0,8µL 2019-nCoV_N1-R (TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG), 0,8 µL 2019-nCoV_N2-F (TTACAAACATTGGCCGCAAA) e 0,8 µL 2019-nCoV_N2-R (GCGCGACATTCCGAAGAA) e água DEPC. O processo ocorreu no StepOne™ Real-Time System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) seguindo os ciclos: 45 °C Fisher reverso, seguido de 95 °C por 10 min e 40 ciclos de 95 °C por 3s , 55 °C por 30s.

3.12 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da quantidade de RNA viral obtidos após o processo de filtragem estão demonstrados na tabela 5.

Tabela 5: Porcentagem de RNA viral removida da água pelos diferentes filtros

Filtros	Nanofiltro branco			Nanofiltro com biomassa		
	F1	**F3**	**F5**	**F2**	**F4**	**F6**
Média cópias virais/ mL pós filtragem	241142	213729	321708	183215	239825	213193
Carga viral/mL retida no filtro	241871	269284	161305	299798	243188	269820
% removida da água pelo filtro	50,075464	55,75088041	33,39558	62,06831	50,34813	55,86185
Média das %	**46,40731% carga viral removida da água pós filtragem**			**56,09276% carga viral removida da água pós filtragem**		

Quando observada a média da eficácia de filtragem dos diferentes filtros, verifica-se que os filtros produzidos com a biomassa da microalga *Spirulina maxima* tiveram uma melhor eficácia de filtragem (56,09276%). Como as células das microalgas apresentam um tamanho muito reduzido o uso de microalgas torna-se viável e sustentável, com muitos resultados positivos pois são capazes de remover de forma eficiente os metais pesados, contaminates e resíduos existentes em meios e águas residuais (ABDEL-RAOUF; AL-HOMAIDAN; IBRAHEEM , 2012).

Na tabela 6 está demonstrada a porcentagem da carga viral que ficou retida no filtro após a passagem da água contaminada.

Tabela 6: Porcentagem da carga viral retido na Nanofibra

Filtros	Nanofiltro branco			Nanofiltro com biomassa		
	F1	**F3**	**F5**	**F2**	**F4**	**F6**
Média Cópias virais/ mL na Nanofibra	1864	684	1862	350	900	688
Remoção no Material (CP-NF)	481149	482329	481151	482663	482113	482325
% SARS-CoV-2 retida nanofibra	0,3859109	0,141611095	0,385497	0,072462	0,18633	0,142439
% retida nos outros materiais do filtro 100-NF	49,689553	55,60926932	33,01008	61,99585	50,1618	55,71941
Média das % dos Diferentes filtros	46,103			55,959		

Verifica-se que os filtros com diâmetro nanométrico produzidos a partir da biomassa de *Spirulina maxima* obtiveram melhor eficácia no processo de retenção viral (55,959%). Yun *et al*. (2007) estudaram o desempenho de filtros de fibra de poliacrilonitrila (PAN) na remoção de partículas nanométricas com diâmetros inferiores a 80 nm. As fibras, cujos diâmetros variavam entre 270 a 400 nm, foram preparadas por deposição eletrostática (*eletrospinning*) e apresentaram maior uniformidade quando comparadas com as fibras dos filtros comerciais. Verificou-se que a eficiência de coleta era função da espessura do filtro, sendo que quanto maior a espessura, menor era a penetração.

Estudos também mostram que a *Spirulina sp* apresenta atividade antiviral e de acordo com Rechter *et al.* (2006) extratos de *S. platensis* mostraram inibir a replicação de vírus humano, como, citomegalovírus, vírus herpes simplex, herpes vírus humano tipo 6 e o vírus da imunodeficiência humana tipo 1, *in vitro*.

Hayashi e Hayashi (1996) demonstraram que a mesma microalga inibiu a replicação de vírus envelopados, tais como vírus herpes simplex tipo 1 e vírus da imunodeficiência humana tipo 1.

Diante da preocupação com a preservação do meio ambiente e com a saúde pública, surgiram os sistemas de tratamento de água residuárias. Os processos convencionais estão presentes desde os tempos mais antigos, porém, verifica-se que eles são ineficientes ou caros quando se trata de remoção de nitrogênio (N), fósforo (P), metais tóxicos, metais pesados (RAJASULOCHANA e PREETHY, 2016; LAM *et al*., 2018), e estes elementos acabam sendo lançados nos corpos receptores, cuja capacidade de autodepuração é inferior ao volume depositado (VAN DEN HEND *et al*., 2011; KUMAR *et al*., 2018). Assim, estes efluentes, antes do lançamento, necessitam de um tratamento complementar e/ou uso de tecnologias complementares, como, por exemplo, o uso de nanofiltros a base de biomassa de microalgas.

A grande necessidade de inovação para os processos de tratamento de água convencional faz com que os nanofiltros bio/tecnológicos se apresentem como uma das grandes soluções futuras para a descontaminação da água. Suas excelentes propriedades estruturais e químicas tornam esse material de grande interesse social e econômico.

Tendo em vista que o novo Coronavírus está presente nas fezes de indivíduos contaminados, incluindo portadores assintomáticos, e vem sendo detectado nas redes de esgoto em várias partes do mundo, pode-se concluir que o monitoramento da presença do vírus nas águas residuais constitui ferramenta epidemiológica relevante para o monitoramento da COVID-19. Esse monitoramento pode levar a tomada de medidas precoces e mais efetivas no combate ao avanço da taxa de contágio. (CRUZ *et al*., 2021).

Embora o contágio envolvendo águas residuais não tenha sido comprovado, é importante observar todas as formas de contágio que o novo Coronavírus possa ter, considerando a extensão da pandemia que vivenciamos há mais de um ano. Estudos visando a diminuição da carga viral em redes de esgotos para excluir essa forma de transmissão também são importantes. (SOUZA *et al*., 2020).

Os nanofiltros se mostram como uma das grandes alternativas para a descontaminação e purificação das fontes de água potável, recurso esse que está se tornando limitado e é de extrema importante para a sobrevivência dos seres vivos.

Nesse sentido, um maior estudo utilizando novas tecnologias torna-se interessante, ainda mais se tratando de tecnologias sustentáveis e de baixo custo operacional.

CONCLUSÕES

Os filtros obtidos através da nanoesfera produzida a partir da biomassa da *Spirulina maxima* cultivada em laboratório em sistema fechado e floculada com NQ em temperatura ambiente, foram desenvolvidos com sucesso pela técnica de *eletrospinning*, revelando pela microscopia eletrônica diâmetros manométricos.

Conseguiu-se obter uma satisfatória eficácia de filtração com o filtro 22 G, sendo que este também, de acordo com a análise microbiológica, apresentou ausência de microrganismos fecais/termotolerantes, auxiliando no controle da filtração de partículas, tornando a água mais potável e segura para consumo, pelos parâmetros analisados.

Os constituintes dos nanofiltros, como os bioativos da biomassa microalgal contidos na nanoesfera 2, atuaram para a eficácia do mesmo, pelas propriedades de biossurfactantes / tensoativas, quelantes de metais e agentes antimicrobianos, além da morfologia e diâmetro das fibras, que se mostrou promissor para fins de erradicação de substâncias orgânicas e purificação da água.

Para melhor entendimento sobre a capacidade de biorremediação, realizamos ensaios antimicrobianos com a nanoesfera isoladamente. O ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) não apresentou atividade antimicrobiana *in vitro* contra nenhum dos microrganismos testados, não foram capazes de interferir na formação de biofilme e pelo método disco-difusão verificou-se a ausência de atividade inibitória da nanoesfera sobre as bactérias Gram- positivas e Gram-negativas.

Sendo assim, pode-se concluir que a nanoesfera contendo biomassa da microalga *Spirulina* não apresentou capacidade antimicrobiana e sim de filtração/retenção na forma de nanofibras que constituíram o filtro produzido.

Os resultados obtidos através da técnica de caracterização do MEV estão de acordo com a literatura, no que tange a aplicação do *electrospinning*, como técnica adequada para a produção de fibras de diâmetro reduzido, além de ser uma metodologia simples e rentável, é capaz de produzir nanofibras contínuas de diversos materiais a partir de diferentes biopolímeros para aplicações industriais.

Os filtros caracterizados pela técnica DRX mostraram resultados referentes á valores de picos e cristalinidade do polímero PCL, condizentes aos da literatura.

A identificação de novas tecnologias capazes de reduzir a carga viral é de extrema importância, uma vez que o comportamento e a infecciosidade do SARS-CoV-2 no ambiente ainda não estão claros. Com isso, utilizar um biomaterial ecologicamente correto e barato é uma alternativa sustentável para a limpeza e também para o biomonitoramento da ocorrência do vírus disseminado no meio ambiente.

Através disto, destaca-se de forma positiva o uso de Nanofiltros biotecnológicos a base de biomassa microlagal de *Spirulina maxima*, como uma alternativa inovadora para o tratamento de efluentes juntamente com a descontaminação de cursos d’água para evitar uma maior contaminação do COVID-19 por meio de veiculação hídrica.

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAOUF, N.; AL-HOMAIDAN, A.A.; IBRAHEEM, I.BM. Microalgae and wastewater treatment. Saudi Journal of Biological Sciences, v. 19, n. 3, p. 257-275, 2012.

ADELODUN, B., AJIBADE, FO, IGHALO, JO, ODEY, G., IBRAHIM, RG, KAREEM, KY, BAKARE, HO, TIAMIYU, AO, AJIBADE, TF, ABDULKADIR, TS, ADENIRAN, KA, CHOI, KS. Avaliação da desigualdade socioeconômica com base no uso de água contaminada por vírus em países em desenvolvimento: uma revisão. 2020.

AGUIAR, CARINE SOUZA. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO VENENO TOTAL DE SERPENTES DOS GÊNEROS Bothrops E Crotalus. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciência da Saúde, 79 f. Il. 2014.

AHMED, W. *et al.* Decay of SARS-CoV-2 and surrogate urine hepatitis virus RNA in untreated wastewater to inform application in wastewater-based epidemiology. Environmental Research, v. 191, n. August, p. 110092, 2020.

ALVES, A. K. Obtenção de micro e nanofibras de TiO2 por electrospinning: caracterização de propriedades e atividade fotocatalítica. 2008, 136p. Tese (Doutorado em Engenharia- Ciência e Tecnologia dos Materiais) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, metalúrgica e de Materiais, PPGE3M/RS, Porto Alegre.

AUGUSTINE, R.; MALIK, H. N.; SINGHAL, D. K.; MUKHERJEE, A.; MALAKAR, D.; ALARIKKAL, N.; THOMAS, S. Electrospun polycaprolactone/ZnO nanocomposite membranes as biomaterials with antibacterial and cell adhesion properties. **Journal of Polymer Research**, v. 21, n. 3, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s10965-013-0347-6

AZEVEDO, J. R; SIZILIO, R.H; BRITO, M.B; COSTA, A.M.B; SERAFINI, M.R.; ARAÚJO, A.A.S; SANTOS, M.R.V; LIRA, A.A.M; NUNES, R.S. Physical and chemical characterization insulin-loaded chitosan-TPP nanoparticles. **J Therm Anal Calorim**. v. 106, p. 685-689, 2011.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.

BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. In: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. London: Blackwell Science, 2004. p.312-351.

BERNARDI, SD *et al.* Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: in vitro and *in vivo* assessments. **Journal of Nanobiotechnology**. v. 9, n.44, 2011.

BOROWITZKA, M.A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology.** V. 70, p.313-321, 1999.

BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C.; ***Biotechnol.*** *Adv.* **2010**, *28*, 325.

BHOWMICK GD, DHAR D, NATH D, GHANGREKAR MM, BANERJEE R, DAS S, CHATTERJEE J. Surto de doença de coronavírus 2019 (COVID-19): algumas consequências graves com o ciclo urbano e rural da água. NPJ Água Limpa. 2020

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem, Ottawa, v. 27, n. 8, p. 911-917, 1959.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n.º 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União, Brasília, 14 de dezembro de 2011.

CHEN, M *et al.* Skin penetration and deposition of carboxyfluorescein and temoporfin from different lipid vesicular systems: In vitro study with finite and infinite dosage application. **International Journal of Pharmaceutics.** v. 408, n.1-2, p. 223- 234, 2015.

CHU, W.-L.; LIM, Y.-W; RADHAKRISHNAN, A. K.; LIM, P.-E. Protective effect of aqueous extract from Spirulina platensis against cell death induced by free radicals. **BCM Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, n. 53, p.1472-6882, 2010.

CALVO, P., C. REMUNAN-LOPEZ, J. L. VILA-JATO, ALONSO, M. J. Chitosan and chitosan/ethylene oxide propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. **Pharmaceutical Research**. v.14, n. 10, p. 1431-1436, 1997.

CDC, 2020. Página inicial dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças. Disponível .https ://www. cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/rt-pcr-panel-fordetection-instructions.pdf. (Acesso em 14 de fevereiro de 2020).

CIFERRI, O.; TIBONI, O. The biochemistry and industrial potential of Spirulina. **Annual Review of Microbiology**, v. 39, p. 503-526, 1985.

COLLA, L. M. *et.al.* Fatty acids profile of Spirulina platensis grown under different temperatures and nitrogen concentrations. **Zeitschrift fur Naturforschung**, Tübingen, v. 59c, p. 55-59, 2004.

CRUZ, K. A. T. et al. PRINCIPAIS ASPECTOS DO NOVO CORONAVÍRUS SARSCoV- 2: UMA AMPLA REVISÃO. Arquivos do MUDI, v. 25, n. 1, p. 73–90, 2021.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial Production of Surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, 47-64, 1997

DESHNIUM, P. *et.al.* Temperature-independent and dependent expression of desaturase genes in filamentous cyanobacterium Spirulina platensis strain C1 (Arthospira sp. PCC 9438). **FEMS Microbiology Letters**, Birmingham, v. 184, p. 207-213, 2000.

DIAS, Diogo Lopes. "Filtração a vácuo"; **Brasil Escola**. Disponível em: https://brasilescola.uol.com.br/quimica/filtracao-vacuo.htm. 2021.

DI BERNARDO, Luiz. Métodos e técnicas de tratamento de água. [S.l: s.n.], 1993.

DORLASS EG, OLIVEIRA CM, VIANA AO *et al*. Lower cost alternatives for molecular diagnosis of COVID-19: conventional RT-PCR and SYBR Green-based RT-qPCR [Internet]. Brazil J Microbiol 51:1117–1123, 2020.

DUARTE, A. R. C., MANO, J. F., REIS, R. L. Preparation of chitosan scaffolds loaded with dexamethasone for tissue engineering application using supercritical, **European Polymer Journal,** 45, 141 -148, 2009.

DWEVEDI, A. . *Soluções para problemas ambientais envolvendo nanotecnologia e tecnologia de enzimas.* Cambridge, CA: **Academic Press**, 2019.

FELLER, R. *et al.* Comparative study of biochemical composition of five microalgae for biodiesel/ bioproducts application. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 1499-1506, 2015.

FESSI, H.; PUISIEUX, J. P.; DEVISSAGUET, N.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. 1 -4, 1989.

FONSECA, F.N; MICHELON, W.; MEZZARI, M.P.; SILVA, M. L.B. Avaliação do uso de Nanopartículas de Quitosana na coagulação/floculação de microalgas crescidas em efluente suinícola. **VII Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio**. Embrapa. 2014.

GENNES, P.G. Wetting: statics and dynamics. Reviews of Modern Physics, v. 57, n. 3, Part I, p. 827- 863, 1985.

GRAHAM K, O.M., RAETHER T, GRAFE T, MCDONALD B, KNAUF P., in Fifteenth Annual Technical Conference & Expo of the American Filtration & Separations Society. 2002: Galveston

Guibal, E., Von Offendberg Sweeney, N., Zikan, M.C., Vicent, T. & Tobin, J.M. Competitive sorption of platinum and palladium on chitosan derivatives. **International Journal of Biological Macromolecules,** 28: 401-408. 2001.

HAIDER, A.; HAIDER, S.; KANG, I.-K.; ***Arab. J. Chem***., *11*, 1165, 2019.

HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A.; ***Biotechnol.*** *Adv*. 2012, *30*, 709. 2012.

HAYASHI, T.; HAYASHI, K. Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga Spirulina platensis. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 1, p. 83-87, 1996.

KHAN MH, YADAV H. Sanitização durante e após o COVID-19 pandemia: uma breve revisão. Trans Indian Natl AcadEng 5:617–627. 2020.

KUMAR, P.K.; KRISHNA, S.V.; VERMA, K.; POOJA, K.; HIMABINDU, V. Phycoremediation of sewage wastewater and industrial flue gases for biomass generation from microalgae. South African Journal of Chemical Engineering, v. 25, p. 133-146, 2018.

KUMAR, A., JENA, HM. Adsorção de Cr (VI) da fase aquosa por alta superfície carvão ativado de área preparado por ativação química com ZnCl2. Processo Saf. Ambiente. Proteger. 109, 63-71. 2017.

KUMAR, P.S., SAHAY, R., ARAVINDAN, V., SUNDARAMURTHY, J., WONG CHUI, L., THAVASI, V., MHAISALKAR, S.G., MADHAVI, S. AND SEERAM, R., 2012. Sundaramurthy et al. / **Biofuel Research Journal 2** . 44- 54 52 standing electrospun carbon nanofibres-a high performance anode material for lithium-ion batteries. J. Phys. D: Appl. Phys. 45, 265302. 2014.

LAGHRIB F, FARAHI A, BAKASSE M, SAQRANE S, EL MHAMMADI MA (2021) Revisão sobre a contaminação de águas residuais pelo vírus COVID-19: impacto e tratamento. Sci Total Environment 751:e142325. 2021.

LAM; LEE, T.M; CHEN, C.Y; CHANG, J.S. Estratégias para controlar contaminantes biológicos durante o cultivo de microalgas em lagoas abertas. Bioresource Technology, v. 252, p. 180-187, 2018.

LIMA, R. S. C. Desenvolvimento de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos: Quitosana/ Insulina. 112f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos). Curso de Engenharia de Processos da Universidade Federal de Campina Grande. 2010.

LIU, D., THOMPSON, JR, CARDUCCI, A., BI, X. Potencial transmissão secundária de SARS-CoV-2 via águas residuais. Sci. Ambiente Total. 749, 142358.https://doi.org/ 10.1016/j.scitotenv.2020.142358. 2020.

LLANOS, J.H.R. Propriedades físicas de filmes de quitosana dopados como condutores iônicos. 2014. 111f. **Dissertação (Mestrado em Ciências)** - Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2014.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. Editora Rima, São Carlos-SP, 2006.

LUCENA, G.L.; SILVA, A.G.; HONÓRIO, L.M.C., SANTOS, V.D. Remoção de corantes têxteis a partir de soluções aquosas por quitosana modificada com tioacetamida. Revista Ambiente & Água - **An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 8, n. 1, p. 144-154, 2013. DOI:10.4136/ambi-agua.973.

LUO, D.; SANG, L.; WANG, X.; XU, S. LI, X. Low temperature, pH-triggered synthesis of collagen-chitosan-hydroxyapatite nanocomposites as potential bone grafting substitutes. Materials Letters, v. 65, p. 2395-2397, 2011.

LUZ, A. P.; RIBEIRO, S.; PANDOLFELLI, V. C. Artigo revisão: Uso da molhabilidade na investigação do comportamento de corrosão de materiais refratários. Cerâmica, v. 54, p. 174-183. São Paulo, 2008.

MACHADO, PTG *et al.* Development of propolis Nanoparticles for the treatment og bovine mastitis: in vitro studies on antimicrobial and cytotoxic activities. **Canadian Journal of Animal Science.** v. 99, n.4, p. 713-723, 2019.

MI, X., ALBUKHARI, SM; HELDT, CL; HEIDEN, PA. Adsorção de vírus e cloro em nanofibras de celulose modificadas com guanidina usando ligações covalentes e de hidrogênio. Carboidrato. Res. 498, 108153. 2020.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI. Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification – diffusion methods Critical comparison. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 163, p. 90-122, 2010.

MOTHÉ, G. P. B.; SOUZA G. R.; FREITAS, R. V. M.; MARCHON, C. L. R.; SILVA, J. T. S.; ALMEIRA, T. F.; DELATORRE, A. B.; INTORNE, A. C. Elaboração de práticas e uso de oficinas e ciências para promover a educação ambiental. Brazilian Journal of Development, Curitiba, v. 6, n. 7, p. 49449-49467 jul. 2020.

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M.; Biossurfactantes: propriedades e aplicações. Química Nova, v. 25, n. 5, 772-776, 2002.

OLGUÍN, E. *et al*. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of Spirulina sp. (Arthospira) gown on digested pig waste. **Bioresource Technology**, Essex, v. 77, p. 19-24, 2001.

Oliveira, Márcio Roberto da Silva Superfícies super-hidrofóbicas obtidas através de microestruturas litografadas / M.R.S. Oliveira. -- ed.rev. -- São Paulo, 2011. 106 p.

Organização Mundial da Saúde. OMS (2021, 7 de março).

PARISI, A.S.; YOUNES, S.; REINEHR, C.O.; COLLA, L.M. Avaliação da atividade antibacteriana da microalga *Spirulina platensis.* Rev Ciênc Farm Básica Apl., 2009;30(3):297-301.

PEIXOTO, Sandra Cadore ; TEIXEIRA , Adriano ; MACIEL, Anderson,; MARKUS, Andressa Lara; FREITAS, Luana ; SCHALENBERGER, Matheus Severo; SALAZAR,Rodrigo Fernando dos Santos. Avaliação da qualidade da água da Região de Santa Maria. **Ciência e Natura** v.38 n.1, p. 435 – 444. 2016.

PIANTA, R. et al. Micro and ultrafiltration of karstic Spring water. Desalination 117: p.61-71, 1998.

POLO D, Quintela-Baluja M, Corbishley A, Jones DL, Singer AC, Graham DW, Romalde JL. Fazendo ondas: Epidemiologia baseada em águas residuais para COVID-19 – abordagens e desafios para vigilância e previsão. Água Res 186:e116404. 2020.

RAJASULOCHANA, P.; PREETHY, V. Comparison on efficiency of various techniques in treatment of waste and sewage water – A comprehensive review. Resource-Efficient Technologies, v. 2, n. 4, p. 175-184, 2016.

RAO, J.P.; GECKELER, K.E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size - control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 887-913, 2011.

RECK, L.; ABREU, K. V.; DAVI, D. M. B.; MAGALHÃES, C. E. C.; ALVES, C. R.; PIRES-CAVALCANTI, K. M. S.; **12º *Encontro Brasileiro sobre Adsorção***, *Gramado*, Brasil, 2018.

REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug - loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine,** v. 2, p. 8 -21, 2006.

RESOLUÇÃO CONAMA Nº 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005. http:// www.mma.gov.br/port/conama

ROLLEMBERG, S.; BARROS, A. N. DE; LIMA, J. P. M. DE. Avaliação da contaminação, sobrevivência e remoção do coronavírus em sistemas de tratamento de esgoto sanitário. Revista Tecnologia, v. 41, n. 1, p. 1–15, 2020.

SAVAGE, N., DIALLO, M.S. Nanomaterials and Water Purification: Opportunities and Challenges. *J Nanopart Res* 7, 331–342 (2005).

Schmuhl, R., Krieg, M.H. & Keizer, K. Adsorption of Cu (II) and Cr (VI) ions by chitosan: kinetics and equilibrium studies. **Water SA**, 27(1): 1-7. 2001.

SHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v.26, no. 5, 726-737, 2003.

SOUZA, C. D. F.; MACHADO, M. F.; DO CARMO, R. F. Human development, social vulnerability and COVID-19 in Brazil: A study of the social determinants of health. Infectious Diseases of Poverty, v. 9, n. 1, p. 4–13, 2020.

TANG Z, KONG N, ZHANG X et al . A materiais - perspec- ciência no combate ao COVID-19. Nat Rev Mater 5:847–860. 2020.

TIYABOONCHAI, W. Chitosan nanoparticles: A promising system for drug delivery. **Naresuan University Journal**, v. 11, n. 3, p. 51 – 66, 2003.

TZU-HUI WU; FENG-LIN YEN; LIANG-TZUNG LIN; TONG-RONG TSAI; CHUNCHING LIN; THAU-MING CHAM. Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 346, p. 160–168, 2008.

VAN DEN HENDE, S.; VERVAEREN, H.; ESMET, S.; BOON, N. Bioflocculation of microalgae and bacteria combined with flue gas to improve sewage treatment. New Biotechnology, v. 29, n. 1, p. 23-31, 2011.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. do C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à química analítica. **Quím. Nova**, v.27, n. 1, 2004.

Wong ACP, Li X, Lau SKP, Woo PCY (2019) Global Epidemiol Bat Coronavírus Vírus 11:e174.https://doi.org/10.3390/v1102 0174. 2019.

YUN, K.M.; HOGAN JR., C.J.; MATSUBAYASCHI, Y.; KAWABE, M.;ISKANDAR, F.; OKUYAMA, K. Nanoparticle filtration by electrospun polymer fibers. *Chemical Engineering Science*, n. 62, p. 4751-4759, 2007.

ZAPATA, P. A.; TAMAYO, L.; PÁEZ, M.; CERDA, E.; AZÓCAR, I.; RABAGLIATI, F. M. Nanocomposites based on polyethylene and nanosilver particles produced by metallocenic “in situ” polymerization: Synthesis, characterization, and antimicrobial behavior. **European Polymer Journal**, v. 47, n. 8, p. 1541–1549, 2011. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2011.05.008

JÉSSICA CRISTINE VIERA MACHADO SANTINI - Profissional multidisciplinar com sólida formação em Engenharia Florestal, Nanociências e Pedagogia, com vasta experiência na área de Ciências Ambientais. Possui graduação Bacharelado em Engenharia Florestal pela Universidade Federal de Santa Maria (2008) e Licenciatura em Engenharia Florestal pelo Programa Especial de de Formação de Professores para a Educação Profissional, pela Universidade Federal de Santa Maria (2014) e é graduada em Pedagogia pela Uninter (2011). É mestre em Agrobiologia pela Universidade Federal de Santa Maria (2012) e doutora em Nanociências pelo Programa de Pós Graduação em Nanociências da Universidade Franciscana de Santa Maria (2023). Atua em pesquisas e oportunidades para aplicar seus conhecimentos e contribuir para o desenvolvimento ambiental sustentável.

MICHELE RORATO SAGRILLO - Cientista com sólida formação em Biologia e Genética e Farmacologia, dedicada à pesquisa e desenvolvimento de produtos inovadores a partir de recursos naturais e resíduos industriais. Atua na Universidade Franciscana de Santa Maria (RS) como docente e orientadora, contribuindo para a formação de novos profissionais e o avanço científico na área de nanociências. Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Santa Maria (2000) e Mestrado em Ciências - área de Genética, pela Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, UNIFESP. Doutora em Farmacologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria- RS.

Spirulina maxima:

DO CULTIVO A APLICAÇÃO (NANO) BIOTECNÓLOGICA

www.atenaeditora.com.br

contato@atenaeditora.com.br

@atenaeditora

www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Ano 2024

Spirulina maxima:

DO CULTIVO A APLICAÇÃO (NANO) BIOTECNÓLOGICA

www.atenaeditora.com.br

contato@atenaeditora.com.br

@atenaeditora

www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Ano 2024